Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Basel

von

Erika Sutter

aus Bühler (Kanton Appenzell)

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1944

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546713_0050

Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Basel

von

Erika Sutter

aus Bühler (Kanton Appenzell)

Bern / Buchdruckerei Büchler & Co. / 1944

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. M. Geiger-Huber und Dr. G. Senn.

Basel, den 22. Juni 1943.

Der Dekan: Prof. Dr. H. Erlenmeyer.

Separatabdruck aus: „Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft"
1944, Band 54
(Als Sonderdruck ausgegeben am 30. Juni 1944)

Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze.

Von *Erika Sutter.*

(Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel.)

Eingegangen am 4. Januar 1944.

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung 197
Die chemische Bestimmung des Heteroauxins 199
Prinzip der Methode 199
Weitere Ausarbeitung der Methode 200
a) Die Durchführung der Bestimmung 200
b) Die Bedeutung der Reagenzien und Versuchsbedingungen für den Ausfall der Reaktion 202
1. Reagenzien 202
2. Einfluß der Glyoxylsäure 203
3. Einfluß des Kupfersulfats 204
4. Einfluß der Schwefelsäure 204
5. Dauer der Wasserbadbehandlung 205
6. Wartezeit zwischen dem Zusatz der Schwefelsäure und der Wasserbadbehandlung 206
7. Beständigkeit der Farbe nach der Wasserbadbehandlung 207
c) Die Anwendung der Methode zur quantitativen Bestimmung des Heteroauxins 208
d) Arbeitsvorschrift 211
Die Aufnahme des Heteroauxins durch die Pflanze 213
Die Versuchspflanze *Cucumis sativus* und ihre Aufzucht 213
Das Wachstum des Hypokotyls von *Cucumis sativus* 214
Die Bestimmung des Heteroauxins in der Versuchslösung 217
Versuche über die Heteroauxinaufnahme durch *Cucumis sativus* 221
a) Vorversuche 221
b) Hauptversuche 223
Theoretische Betrachtungen und Modellversuche 230
Zusammenfassung der Ergebnisse 239
Zitierte Literatur 241

Einleitung.

Über die Aufnahme von Wuchsstoffen aus Lösungen durch die Pflanzen wird bis jetzt in der Literatur nur wenig berichtet. Die meisten Angaben beziehen sich auf Versuche mit Pasten oder Agarwürfeln, bei denen die Verhältnisse nicht immer klar genug sind, da oft weder Paste noch Agarwürfel mit ihrer ganzen, dem Pflanzenorgan aufliegenden

Fläche völlig mit der Pflanze in Kontakt sind. Die ersten quantitativen Ergebnisse über das Eindringen des Wuchsstoffes (Heteroauxin) aus Agarwürfeln in die *Avena*-Koleoptile liefern die Arbeiten von Thimann und Bonner (1932, 1933). Skoog (1938) untersuchte die Wuchsstoffaufnahme durch Wurzeln von Tomatenpflanzen aus wuchsstoffhaltigen Nährlösungen. Diese Autoren stellten zwischen der von der Pflanze aufgenommenen Menge und der gebotenen Wuchsstoffkonzentration eine direkte Proportionalität fest. Weiter konnten Albaum, Kaiser und Nestler (1937) zeigen, daß Zellen von *Nitella,* einer Pflanze, deren Wachstum von Streckungswuchsstoffen allerdings nicht beeinflußt wird, so lange Wuchsstoff aus der umgebenden Lösung aufnehmen, bis die Wuchsstoffkonzentration des Zellsaftes diejenige der Außenlösung erreicht hat. Die Geschwindigkeit der Aufnahme hängt vom C_H ab : je saurer die Lösung ist, desto rascher dringt der Wuchsstoff ein.

Der Grund, weshalb die Wuchsstoffaufnahme wenig bearbeitet ist, mag in der Hauptsache darin liegen, daß es an einer geeigneten Methode für die Wuchsstoffbestimmung fehlte. Die biologischen Testmethoden sind zwar sehr empfindlich, aber ungenau : z. B. berechnete Goodwin (1939 a) den Fehler des Avena-Testes nach Went und Boysen-Jensen zu 5—50 %, und Juel (1936) stellte eine mittlere Abweichung der Einzelwerte von zirka 10 % fest. Die biologischen Teste sind auch von der Variation des Versuchsmaterials (was übrigens oft zu wenig berücksichtigt wird) und von unkontrollierbaren äußeren Bedingungen, wie Wetter, Jahreszeit usw., stark abhängig (Kögl 1933, Kögl, Haagen-Smit und van Hulssen 1936, Juel 1936, Söding und Funke 1941). Weiter können Hemmstoffe einen kleineren Wuchsstoffgehalt vortäuschen, als er in Wirklichkeit vorhanden ist (z. B. Goodwin 1939 b, Larsen 1939, Linser 1940, Funke 1943).

Aus diesen Gründen ist für gewisse Untersuchungen eine chemische Bestimmungsmethode der biologischen vorzuziehen, da sie von den genannten äußeren Bedingungen unabhängig und meistens auch genauer ist. Die Verwendung einer chemischen Methode setzt voraus, daß sie für die physiologischen Bedürfnisse genügend empfindlich ist. Es gibt nun für die β-Indolylessigsäure eine Reihe von Farbreaktionen, die zum Teil einen Nachweis des Heteroauxins bis zu Konzentrationen von 10^{-5} molar erlauben — also Konzentrationen, die das Wachstum von Sproßorganen noch fördern, dasjenige der Wurzeln aber stark hemmen (Scheer, 1937, gibt als optimale Konzentration für die *Avena*-Koleoptile $3{,}8 \cdot 10^{-4}$ molar an). Bis jetzt wurden die chemischen Methoden, in der Hauptsache die von Salkowski (1885) und die von Winkler und Petersen (1935) angegebenen, in der Hormonphysiologie nur von wenigen Autoren verwendet, z. B. von Ruge (1937) und Hitchcock und Zimmerman (1938) zum qualita-

tiven, von Albaum, Kaiser und Nestler (1937) und Mitchell und Brunstetter (1939) zum quantitativen Nachweis. Für meine Untersuchungen wählte ich die Bestimmungsmethode von Winkler und Petersen (1935). Es war allerdings erforderlich, diese Methode auf ihre Brauchbarkeit für die Bestimmung der Wuchsstoffaufnahme durch Pflanzen zu prüfen. Infolgedessen gliedert sich die vorliegende Arbeit in zwei Teile, einen ersten über die Bestimmungsmethode und einen zweiten über die Wuchsstoffaufnahme durch Pflanzen.

Die chemische Bestimmung des Heteroauxins.

Prinzip der Methode.

Die quantitative Bestimmung des Heteroauxins wird nach der von Winkler und Petersen (1935) angegebenen Methode ausgeführt. Im Prinzip beruht diese auf der Adamkiewicz-Hopkinsschen Tryptophanreaktion : Bei Zusatz von Glyoxylsäure und Schwefelsäure zur Lösung eines Indolderivates tritt eine Färbung auf, die für die betreffende Indolverbindung charakteristisch ist. Diese Reaktion dient allgemein zum qualitativen Nachweis von Tryptophan oder anderen Indolderivaten; Winkler (1934) arbeitete sie zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung des Tryptophans aus. Mit wenigen Abänderungen verwendete er sie auch für den quantitativen Nachweis des Heteroauxins (= β-Indolylessigsäure) entsprechend folgender Vorschrift (Winkler und Petersen, 1935) :

Zu 1,00 cc β-Indolylessigsäure (in der Arbeit im weiteren als IES abgekürzt) gibt man 0,80 cc auf $^1/_{10}$ verdünnte Glyoxylsäurelösung « nach Benedict » und 0,20 cc m/100 Kupfersulfat und füllt bis zu 3,00 cc mit Aqua dest. auf. Diese Lösung wird unter 0° C abgekühlt, und dann setzt man unter weiterer Kühlung und guter Durchmischung 5,00 cc konzentrierte, vorgekühlte Schwefelsäure langsam und portionenweise zu. Man läßt die Lösungen bei Zimmertemperatur drei bis vier Stunden oder über Nacht stehen und erhitzt sie hierauf gleichzeitig 5 Minuten im kochenden Wasserbad, wobei die violettrote Farbe auftritt; haben sie Zimmertemperatur angenommen, so werden sie kolorimetrisch gemessen. Es lassen sich so 3 γ [1] IES in 1 cc Bestimmungsgemisch noch nachweisen. Störend wirken Oxydationsmittel; Reduktionsmittel, wie schweflige Säure und Formaldehyd sind ohne Einfluß. Die höchste Farbintensität wird dann erreicht, wenn auf zwei Mol Kupfersulfat und ein Mol Glyoxylsäure ein Mol IES kommt. Da das Beersche Gesetz erfüllt ist, eignet sich die Farbreaktion für die quantitative Bestimmung der IES.

---

[1] $1\,\gamma = 10^{-6}$ g.

Weitere Ausarbeitung der Methode.

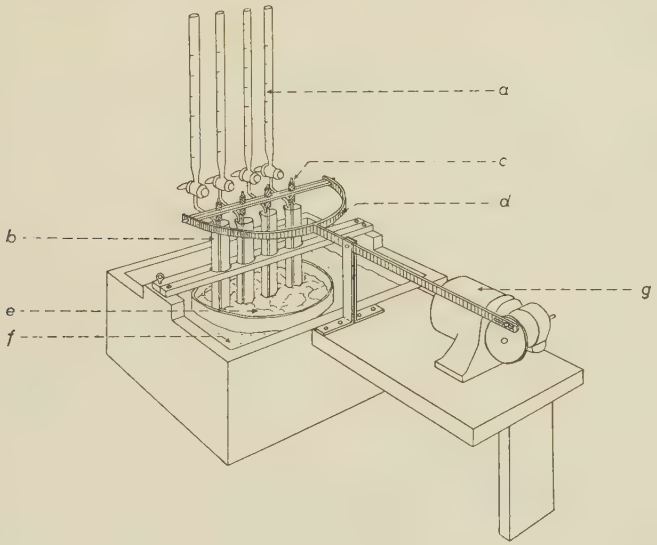
Im Hinblick auf die äußerst geringen Wuchsstoffmengen, die bei Pflanzen wirksam sind (s. Geiger-Huber und Burlet, 1936), bestand ein Hauptteil der mir gestellten Aufgabe darin, zu untersuchen, ob diese Methode des Heteroauxinnachweises eventuell empfindlicher gestaltet und ob sie bei hormonphysiologischen Untersuchungen an Pflanzen überhaupt angewendet werden könne. Um diese Aufgabe zu lösen, wurde der Einfluß der verschiedenen Reagenzien und Versuchsbedingungen auf den Ausfall der Farbreaktion eingehend untersucht. Zudem wurde angestrebt, auch die technische Durchführung der Bestimmungsmethode möglichst sicher und einfach zu gestalten. Es konnte bei diesem Bemühen nicht ausbleiben, daß auch Versuche und Abänderungen unternommen wurden, die entweder nicht zum Ziele führten oder sogar die Resultate verschlechterten. Hierüber soll nicht berichtet werden; ich beschränke mich lediglich darauf, die Hilfsmittel anzugeben, die zu einer Verbesserung führten, und die Resultate jener Versuche mitzuteilen, die über den Einfluß der Reagenzien auf Genauigkeit und Empfindlichkeit der Methode Aufschluß geben. Diese Untersuchung erlaubte dann auch die Aufstellung einer Arbeitsvorschrift, nach der die Heteroauxinbestimmungen des physiologischen Teils der Arbeit immer ausgeführt wurden.

a) Die Durchführung der Bestimmung.

Um die Ausführung der Bestimmung sicherer zu gestalten und auch um den Arbeitsgang abzukürzen, wurde eine geeignete Apparatur zusammengestellt (s. Fig. 1).

Damit nämlich die Farbreaktion gleichmäßig ausfällt, ist es unbedingt notwendig, daß man beim Zusatz der Schwefelsäure die Lösung gut durchmischt und eine lokale Erhitzung sicher vermeidet. Dies wird mit Hilfe eines einfachen Rührwerkes und durch langsamen Zusatz der Schwefelsäure aus Büretten erreicht. Das Rührwerk besteht aus Glasrührern, die durch einen Hebelarm in den Reagensgefäßen auf und ab bewegt werden (zirka 100mal pro Minute); der Antrieb erfolgt durch einen geeigneten Elektromotor. Die Reagensgefäße stehen während des Rührens in einer Kältemischung. Die Rührer sind als Thermometer ausgebildet; sie bestehen aus Kapillarröhren, die oben geschlossen, unten kugelförmig aufgeblasen sind. Kugel und etwa zwei Drittel der Kapillare sind mit gefärbtem Alkohol gefüllt; zudem sind an der Kapillare auch Temperaturmarken angebracht. Um eine möglichst vollständige Durchmischung der Lösung zu erreichen, wurde der Durchmesser der Kugel nur wenig kleiner als die lichte Weite des Reagensgefäßes gewählt. Damit die für die Heteroauxinbestimmungen notwendige Zeit

möglichst abgekürzt werde, wurden jeweils gleichzeitig vier Reagensgefäße samt den zugehörigen Rührern und Büretten verwendet. In jedes Reagensgefäß mündet eine geeignet ausgebildete Bürette, aus der die Schwefelsäure langsam und tropfenweise der Wandung des



Figur 1.

Schematische Darstellung der Rührapparatur.
a = Bürette mit Schwefelsäure, *b* = Reagensgefäß, *c* = Rührthermometer, *d* = Bügel der Rühreinrichtung, *e* = Kältemischung, *f* = Isoliermaterial, *g* = Elektromotor.

Reagensgefäßes entlang zufließt, damit sie gut vorgekühlt wird, ehe sie die Lösung erreicht. Es läßt sich so leicht verhindern, daß die Temperatur des Bestimmungsgemisches 0° C je übersteigt. Man könnte auch daran denken, die Schwefelsäure bereits gut vorgekühlt in die Büretten einzufüllen. Da jedoch das Zutropfenlassen der notwendigen Menge Schwefelsäure etwa 20 Minuten beansprucht, so würde sie sich in dieser Zeit doch wieder etwas erwärmen; und wenn auch die Reaktion dadurch wohl kaum gestört würde, so wäre es doch sehr schwierig, das Volumen der Schwefelsäure genau abzumessen. Eine Änderung der Temperatur um 5° C bedeutet nämlich bereits eine Volumänderung der konzentrierten Schwefelsäure von etwa 18 %. Aus diesem Grunde muß bei der Zugabe der Schwefelsäure auch darauf geachtet werden, daß ihre Temperatur in den einzelnen Versuchen nicht allzu sehr voneinander abweicht. Die von mir in den Büretten abgemessene Schwefelsäure hatte im allgemeinen eine Temperatur von etwa 15° C.

b) Die Bedeutung der Reagenzien und Versuchsbedingungen für den Ausfall der Reaktion.

1. Reagenzien.

β-Indolylessigsäure: Kristallisiertes Präparat der Firma Hoffmann-La Roche, Basel. Sie wird stets in frisch hergestellten Lösungen verwendet.

Kupfersulfat: Kahlbaum, pro analysi.

Glyoxylsäure: Sie wird hergestellt nach Benedict (1909): 10,0 g Magnesiumpulver werden in einem geräumigen Erlenmeyerkolben mit Wasser überschichtet und unter guter Kühlung 250 cc gesättigte Oxalsäurelösung [1] zugegeben. Das überschüssige Magnesium wird durch Filtrieren entfernt, das Filtrat mit Essigsäure schwach angesäuert und mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Die Lösung ist frei von Oxalsäure. Im Dunkeln ist sie monatelang haltbar; von den stets sich bildenden Niederschlägen wird abfiltriert. Durch Titration mit Kaliumpermanganat stellte ich in der so hergestellten Lösung einen Gehalt an Glyoxylsäure von 0,04 % fest; dieser Wert muß allerdings als ein Höchstwert betrachtet werden, da das Kaliumpermanganat alle eventuell sonst noch vorhandenen oxydierbaren Substanzen oxydiert; Winkler (1934) ermittelte durch Jodtitration 0,03 %.

Schwefelsäure: Zu Beginn meiner Arbeit wurde « konzentrierte Schwefelsäure, Kahlbaum pro analysi, d = 1,84/15° C » verwendet. Infolge des Krieges war sie aber später nicht mehr erhältlich, und es wurde deshalb für alle weiteren Versuche « konzentrierte Schwefelsäure, Kahlbaum DAB 6, d = 1,84/20° C » benützt.

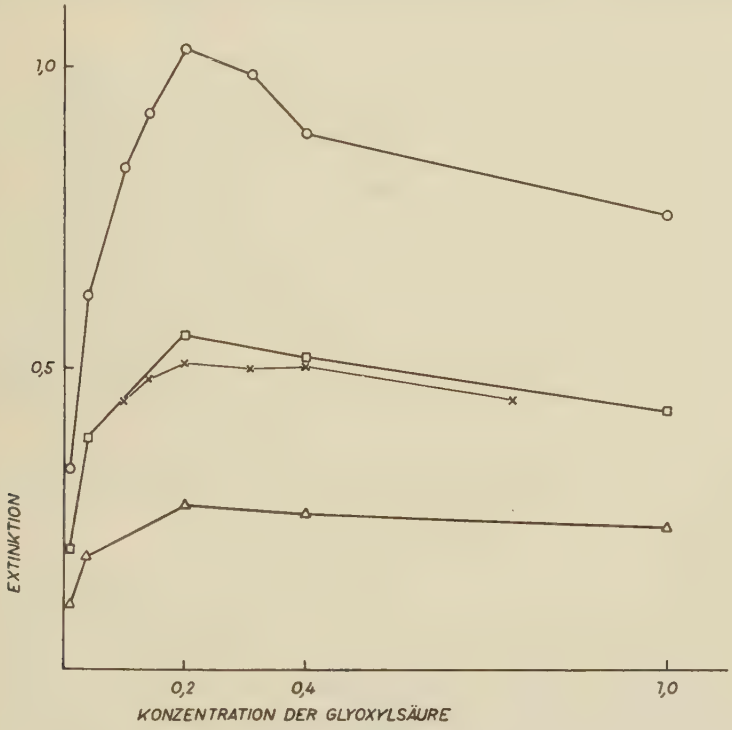
Da zum Kolorimetrieren der Heteroauxinlösungen das Stufenphotometer nach Pulfrich (Firma C. Zeiß, Jena) Verwendung fand und für die günstigste Schichtdicke (30 mm) 10,5 cc Versuchslösung erforderlich sind, wurden die Mengen der Reagenzien unter Beibehaltung ihrer relativen Verhältnisse, wie sie Winkler und Petersen (1935) angeben, folgendermaßen abgeändert: 3,0 cc IES-Lösung, 1,2 cc Glyoxylsäurelösung, 0,3 cc Kupfersulfatlösung und 7,5 cc konzentrierte Schwefelsäure. Bei der Ausarbeitung der Methode wurden im allgemeinen die hier angegebenen Volumina beibehalten und nur die Konzentrationen der Reagenzien variiert.

Als Maß für die Farbintensität wird die Extinktion angegeben (s. S. 209). Alle angegebenen Extinktionswerte beziehen sich, sofern nichts anderes erwähnt, auf die oben angegebene Schichtdicke und auf das Filter S 57 des Zeißschen Stufenphotometers nach Pulfrich. Der Einfachheit halber und um zu sparen verwendete ich beim Kolorimetrieren als Vergleichslösung Wasser an Stelle von Schwefelsäure; die Extinktionswerte sind deshalb alle um 0,015 zu hoch.

[1] Löslichkeit der Oxalsäure in Wasser: 0° C 3,52 %; 20° C 9,52 %; 50° C 31,46 %; nach Steiner (1933).

2. Einfluß der Glyoxylsäure.

Wie schon W i n k l e r (1934) für das Tryptophan feststellte, besteht eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration der Glyoxylsäure und



Figur 2.
Abhängigkeit der Farbintensität von der Konzentration der Glyoxylsäure.
Menge β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch :
△——△ 30 γ } (Mit Schwefelsäure pro analysi.)
□——□ 60 γ
○——○ 120 γ
×——× 60 γ (Mit DAB-Schwefelsäure.)
Kupfersulfat : m/100; Schwefelsäure : 7,5 cc. Dauer der Wasserbadbehandlung : 5 Minuten bei 98° C. Konzentration der Glyoxylsäure als Verdünnung der Stammlösung « nach Benedict » angegeben.

der Farbintensität des Bestimmungsgemisches : er fand eine Optimumkurve. Für die IES gilt nach meinen Untersuchungen das gleiche; das Optimum liegt für die Schwefelsäure pro analysi Kahlbaum bei einer Verdünnung der Stammlösung « nach Benedict » von 1 : 5, für die Schwefelsäure DAB 6 Kahlbaum bei einer Verdünnung von 1 : 3,6. Wichtig ist, daß die optimale Konzentration der Glyoxylsäure im unter-

suchten Bereich von der Konzentration der IES unabhängig ist (Fig. 2).

Bei der Ausführung dieser Versuche wurden alle übrigen Versuchsbedingungen so eingehalten, wie sie Winkler und Petersen (1935) angeben.

3. Einfluß des Kupfersulfates.

Für den Einfluß des Kupfersulfates auf die Farbintensität wurde für das Heteroauxin ebenfalls dieselbe Gesetzmäßigkeit festgestellt, wie sie Winkler (1934) für das Tryptophan angibt. Die Abhängigkeit entspricht einer Exponentialkurve (Fig. 3). Aus den Versuchen geht hervor, daß die Kupfersulfatkonzentration, bei der eben das Maximum der Farbintensität erreicht wird, von der Heteroauxinkonzentration abhängig ist, und zwar so, daß mit steigender Konzentration des Heteroauxins eine größere Kupfersulfatmenge notwendig wird. Zwischen der IES-Konzentration und dem Logarithmus der Kupfersulfatkonzentration, bei der eben die maximale Farbintensität erreicht wird, besteht direkte Proportionalität. Ein Überschuß an Kupfersulfat stört die Reaktion nicht.

Die Versuche wurden mit einer 1 : 3,6 verdünnten Glyoxylsäurelösung und 7,5 cc Schwefelsäure (DAB 6) ausgeführt.

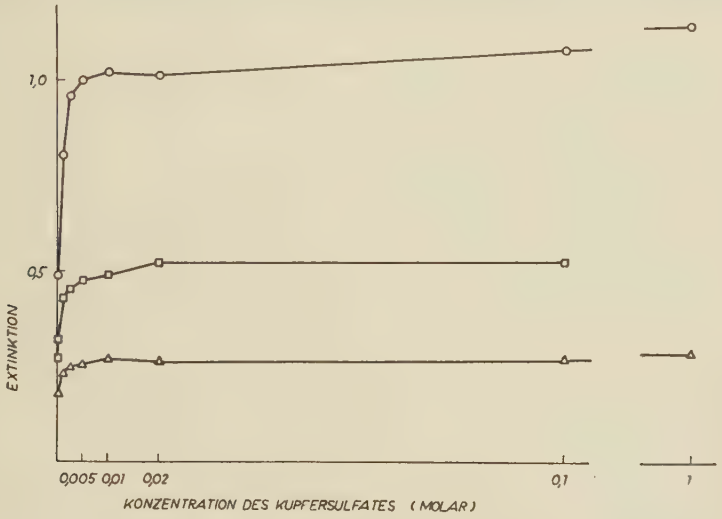
4. Einfluß der Schwefelsäure.

Für diese Untersuchungen wurde die Glyoxylsäure in einer Konzentration von 1 : 3,6 « nach Benedict » und m/20 Kupfersulfatlösung verwendet. Die Menge der zugegebenen Schwefelsäure (DAB 6) wurde variiert und dementsprechend zu den wässerigen Lösungen (IES, Kupfersulfat und Glyoxylsäure) Aqua dest. zugesetzt, so daß das Gesamtvolumen immer 12 cc betrug. Es zeigte sich, daß zwischen der Menge der Schwefelsäure im Bestimmungsgemisch und der Farbintensität eine deutliche Beziehung besteht (s. Fig. 4). Das Optimum liegt wiederum für alle IES-Konzentrationen gleich, nämlich bei einem Verhältnis von Schwefelsäure zu wässeriger Lösung wie 7,0 : 5,0; hingegen nimmt die Steilheit der Kurve mit steigender Konzentration des Heteroauxins zu, was praktisch bedeutet, daß sich Fehler bei der Schwefelsäurezugabe bei höheren Wuchsstoffkonzentrationen stärker auswirken. Es ist deshalb ratsam, bei der Bestimmung möglichst niedrige Heteroauxinkonzentrationen zu verwenden (nicht mehr als 90 γ pro Bestimmungsgemisch).

Obwohl Untersuchungen zeigten, daß die Temperatur des Bestimmungsgemisches auch auf 10—15° C steigen darf, ohne daß sich dies in einer Änderung der Farbintensität bemerkbar macht, so ist beim Schwefelsäurezusatz doch sehr darauf zu achten, daß keine lokale Überhitzung eintritt (s. auch S. 200).

5. Dauer der Behandlung im Wasserbad.

Werden die Lösungen nach Zugabe der Schwefelsäure im siedenden Wasserbad erwärmt, so erreicht die Farbintensität in vier Minuten ihr



Figur 3.

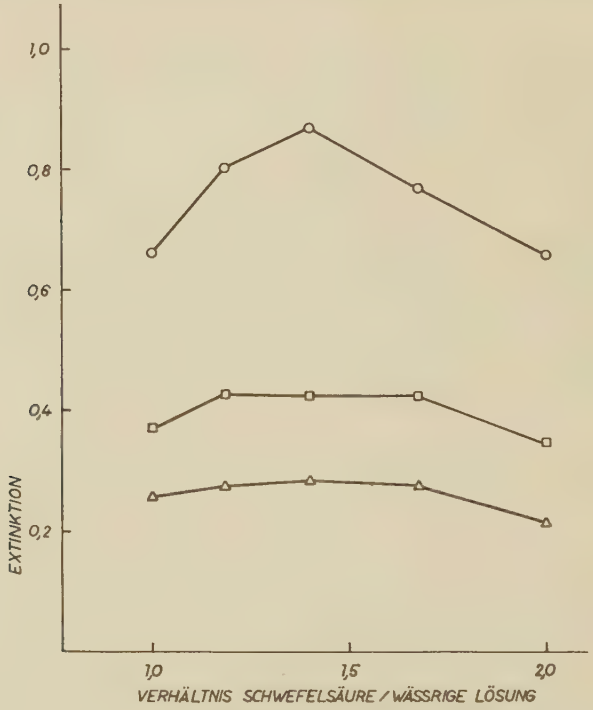
Abhängigkeit der Farbintensität von der Konzentration des Kupfersulfates.
Menge β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch:
△———△ 30 γ
□———□ 60 γ
○———○ 120 γ
Verdünnung der Glyoxylsäure «nach Benedict» 1 : 3,6. Schwefelsäure: 7,5 cc. Dauer der Wasserbadbehandlung: 5 Minuten bei 98° C.

Maximum. Ein längeres Erwärmen der Lösungen bewirkt eine rasche Abnahme der Farbintensität um zirka 10 % der maximalen Intensität pro Minute. Dies bedeutet, daß kleine Differenzen in der Dauer der Wasserbadbehandlung, ungleiches Erwärmen der Lösungen infolge der Form der Gefäße usw. beträchtliche Fehler ergeben können. Auf Grund der RGT-Regel darf erwartet werden, daß bei niedrigen Temperaturen das Maximum langsamer erreicht und die Optimumkurve flacher wird. Dies trifft auch tatsächlich zu (Fig. 5). Außerdem wird aber auch die Farbe mit abnehmender Temperatur intensiver; das bedeutet eine Steigerung der Empfindlichkeit.

Die optimale Dauer der Wasserbadbehandlung ist in dem in Frage kommenden Bereich von der Heteroauxinkonzentration unabhängig (Fig. 5).

6. Wartezeit zwischen dem Zusatz der Schwefelsäure und der Wasserbadbehandlung.

Wenn die Lösungen im Wasserbad langsam erwärmt werden, besteht eventuell die Möglichkeit, die Wartezeit zwischen dem Schwefel-



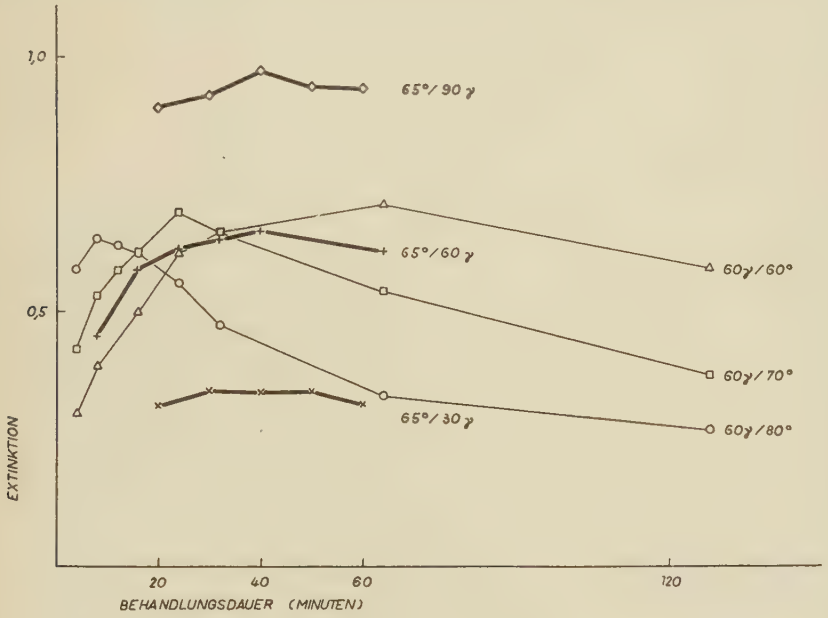
Figur 4.

Abhängigkeit der Farbintensität vom Schwefelsäurezusatz.
Menge β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch:
△——△ 30 γ
□——□ 45 γ
○——○ 90 γ
Verdünnung der Glyoxylsäure «nach Benedict» 1 : 3,6.
Kupfersulfat: m/20. Dauer der Wasserbadbehandlung: 5 Minuten bei 98° C.

säurezusatz und der Behandlung im Wasserbad abzukürzen. Nach Winkler (1934) soll die lange Wartezeit den Zweck haben, die Reaktion langsam einzuleiten, um eine sichere Einstellung des Maximums der Reaktion zu erhalten. Meine Untersuchungen zeigten, daß bei einer Temperatur des Wasserbades von 65° C eine Wartezeit von einer Stunde genügt, um gleichmäßige Werte zu bekommen. Wird zu lange gewartet (mehr als 12 Stunden), so nimmt die Farbintensität ab.

7. Beständigkeit der Farbe nach der Behandlung im Wasserbad.

Es ist wichtig, zu wissen, ob und wieweit sich die Farbe der Lösung nach der Wasserbadbehandlung verändert. Es zeigte sich, daß in dem in Frage kommenden Konzentrationsbereich der IES Farbe und Farbtiefe



Figur 5.

Abhängigkeit der Farbintensität von der Dauer der Behandlung im Wasserbad.
Menge β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch:

30 γ
60 γ
90 γ
} Temperatur des Wasserbades: 65° C.

Temperatur des Wasserbades:

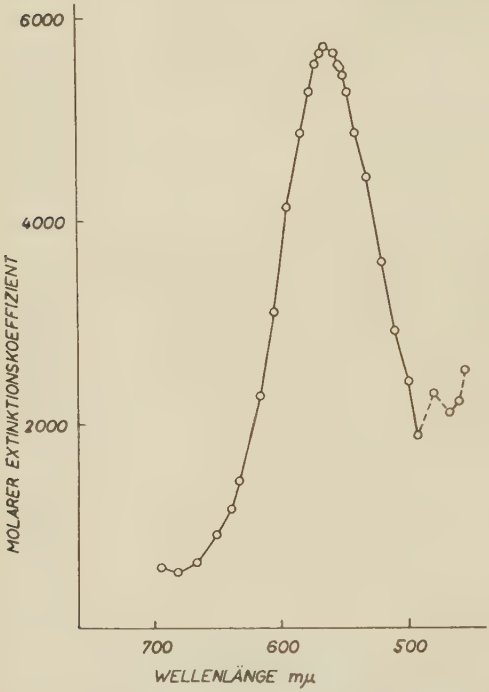
60° C
70° C
80° C
} 60 γ β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch.

Verdünnung der Glyoxylsäure « nach Benedict » 1 : 3,6. Kupfersulfat: m/20; Schwefelsäure: 7,0 cc.

während der ersten 15 Stunden nach der Behandlung im Wasserbad gleich bleiben; nachher nimmt die Farbtiefe stetig ab, während am langwelligen und am kurzwelligen Ende des Spektrums die Absorption etwas zunimmt.

c) Die Anwendung der Methode zur quantitativen Bestimmung des Heteroauxins.

Die Absorptionskurve des IES-Farbstoffes wurde mit dem Spektralphotometer nach Koenig-Martens aufgenommen [1] (Fig. 6). Das Absorp-



Figur 6.
Absorptionskurve des β-Indolylessigsäure-Farbstoffes. Aufgenommen mit Spektralphotometer nach Koenig-Martens. Konzentration der β-Indolylessigsäure: $1{,}43 \cdot 10^{-4}$ molar. (Im gestrichelten Teil der Kurve war die Messung unsicher.)

tionsmaximum liegt bei $\lambda = 5650$ ÅE. Von den Filtern des Zeißschen Stufenphotometers nach Pulfrich sind die Filter S 55 und S 57 dem Absorptionsmaximum am nächsten. Ich wählte für die photometrischen Messungen das Filter S 57 mit dem Filterschwerpunkt 5720 ÅE.

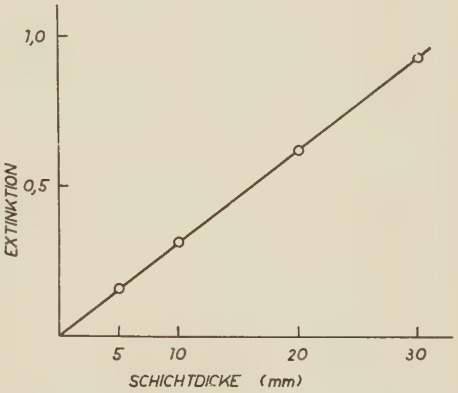
Es wurde nachgeprüft, ob auch bei der gegenüber der Vorschrift von Winkler und Petersen (1935) abgeänderten Ausführung der Reaktion das Beersche Gesetz noch gilt, da dies die kolorimetrische Bestimmung sehr erleichtern würde. Das Beersche Gesetz wird durch die Formel

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d}$$

ausgedrückt, worin I die durch die Lösung hindurchtretende, I_0 die in die Lösung eintretende Lichtintensität bedeutet. ε ist der molare Extinktionskoeffizient, eine bei einer bestimmten Wellenlänge für den absor-

[1] Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. A. Hagenbach für die Erlaubnis, diese Messung in der Physikalischen Anstalt Basel auszuführen, bestens danken.

bierenden Stoff charakteristische Größe, c die Konzentration und d die Schichtdicke der absorbierenden Lösung. Das Produkt $\varepsilon \cdot c \cdot d$ wird als Extinktion[1] bezeichnet; sie ist also gleich dem negativen Logarithmus der Durchlässigkeit. Das Beersche Gesetz sagt aus:



Figur 7.
Abhängigkeit der Extinktion von der Schichtdicke der Lösung.
Menge β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch: 75 γ.

1. Die Extinktion ist der Schichtdicke der Lösung direkt proportional.
2. Die Extinktion ist der Konzentration des Farbstoffes direkt proportional.
3. Wenn der Logarithmus der Extinktion als Funktion der Wellenlänge aufgetragen wird, müssen die Absorptionskurven von Lösungen verschiedener Konzentration einander parallel laufen.

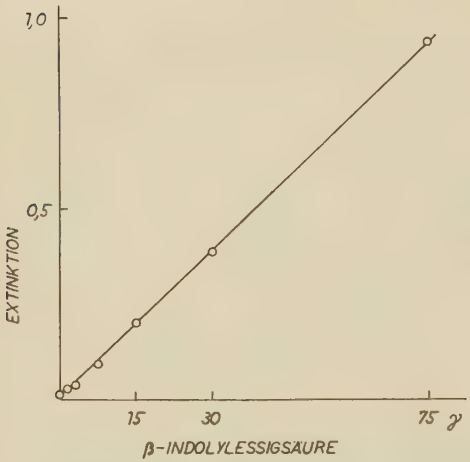
Die Fig. 7 bis 9 zeigen, daß das Beersche Gesetz für unseren Farbstoff erfüllt ist; dies bedeutet, daß zur Aufstellung einer Eichkurve, die in diesem Falle eine Gerade ist, nur zwei Punkte notwendig sind.

Bei den weiteren Untersuchungen ergab sich aber, daß nicht eine streng definierte Eichkurve festgelegt werden konnte, da die Steilheit dieser Kurve aus mir bis jetzt unbekannten Gründen manchmal mehr, manchmal weniger schwankte. Die Schwankungen sind zwar nicht sehr groß (im Mittel $2{,}7 \pm 0{,}5$ %), aber zwischen einzelnen Versuchsreihen manchmal doch ziemlich unregelmäßig; darum wurde bei jedem Versuch die Farbreaktion auch mit einer Kontrollösung von bekanntem IES-Gehalt ausgeführt. Aus dreißig Versuchsreihen, die im Laufe eines halben Jahres ausgeführt wurden, berechnete ich die wahrscheinlichste Lage der Eichkurve; danach entspricht einem Gehalt des Bestimmungsgemisches, d. h. 3 cc IES-Lösung von 30 γ IES eine Extinktion von $0{,}371 \pm 0{,}014$, einem von 75 γ IES eine Extinktion von $0{,}903 \pm 0{,}005$. Da ich als Vergleichslösung beim Photometrieren Wasser verwendete, geht die Kurve nicht

[1] Beim neuen Pulfrich-Photometer kann die Extinktion an der Meßtrommel direkt abgelesen werden.

durch den Nullpunkt; für 0 γ IES muß der Extinktionswert 0,015 eingesetzt werden.

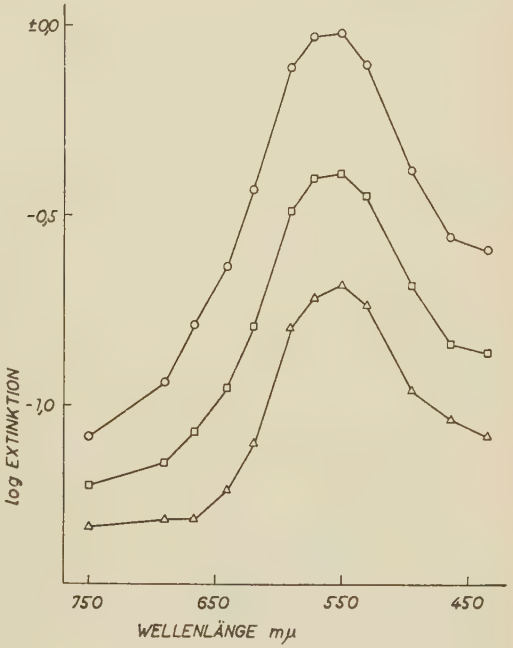
Innerhalb ein und derselben Versuchsreihe sind die Schwankungen gering. In der Regel wurden den auf ihren Gehalt zu prüfenden Hetero-



Figur 8.
Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration der β-Indolylessigsäure. Schichtdicke der Lösung : 30 mm. Konzentration : γ pro 12 cc Bestimmungsgemisch (d. h. 3 cc β-Indolylessigsäurelösung).

auxinlösungen zwei Proben von je 3 cc entnommen, mit denen die Bestimmungen g e t r e n n t durchgeführt wurden. Im Mittel betrug die Differenz zwischen zwei derartigen Parallelbestimmungen 1,3 $\pm$ 0,09 γ (aus sämtlichen, nämlich 163 Doppelbestimmungen berechnet); sie ist von der IES-Menge in der Probe unabhängig. Bei einem Gehalt von etwa 20 γ bis 45 γ IES in 3 cc Probe betrug sie 1,23 $\pm$ 0,21 γ (einundvierzig Doppelbestimmungen), bei 60 γ bis 80 γ 1,32 $\pm$ 0,10 γ (hundertzweiundzwanzig Doppelbestimmungen). Bei den Versuchen über die Wuchsstoffaufnahme durch Pflanzen beträgt der Gesamtfehler der Bestimmung zirka 10 bis 30 γ : Die aus den 25 cc Versuchslösung extrahierte IES wurde nämlich je nach der zu erwartenden Menge mit 10—100 cc Aqua dest. aufgenommen und von der so erhaltenen Lösung je 3 cc für die Bestimmung verwendet. Aus der in diesen 3 cc gefundenen Menge wurde auf den Gehalt der ganzen Lösung geschlossen; das heißt also, daß der Fehler multipliziert wird. Da die aufgenommene Menge als Differenz zwischen der in der Lösung noch v o r h a n d e n e n und der zu Beginn des Versuches g e b o t e n e n IES ermittelt wird, ist sie mit demselben Fehler behaftet. Für eine mittlere Aufnahme von 140 γ (Volumen der Bestimmungslösung 50 cc) ist der Fehler also rund 15 %. Es muß hier aber berücksichtigt werden, daß bei diesen Untersuchungen stets R e i h e n v e r s u c h e und die Versuche m e h r f a c h ausgeführt wurden, wodurch Zufälligkeiten ausgeglichen, die Fehler also wieder geringer werden.

Die Empfindlichkeit der Methode wurde ebenfalls nachgeprüft. Es zeigte sich, daß unter meinen Versuchsbedingungen in Reihenversuchen eben noch 1,5 γ bis 3 γ IES im Bestimmungsgemisch nachgewiesen werden können; zu einer genauen Bestimmung sind aber bei dem verwendeten Photometer 12 γ erforderlich. Durch Verwendung größerer Schichtdicken in geeigneten Küvetten könnten noch etwas geringere Mengen genau bestimmt werden, was aber für meine Zwecke nicht nötig war.



Figur 9.
Logarithmus der Extinktion als Funktion der Wellenlänge bei verschiedenen β-Indolylessigsäurekonzentrationen.
Menge β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch:
△——△ 15 γ
□——□ 30 γ
○——○ 75 γ

d) Arbeitsvorschrift.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche machen es möglich, eine Arbeitsvorschrift aufzustellen, nach der dann alle Heteroauxinbestimmungen des physiologischen Teils der Arbeit ausgeführt wurden. Sie erlaubt eine sichere und genaue Ausführung der Bestimmung und eine Steigerung der Empfindlichkeit von 20 % gegenüber der von Winkler und Petersen (1935) angegebenen Vorschrift.

Folgendes sind die wichtigsten Punkte, deren Berücksichtigung unter meinen Versuchsbedingungen (Messung mit Pulfrich-Photometer, 12 cc Bestimmungslösung, Reinheitsgrad der Reagenzien, insbesondere der Schwefelsäure) erforderlich ist:

1. Der Gehalt des Bestimmungsgemisches an IES darf nicht kleiner sein als 12 γ und nicht größer als 90 γ. Bei Farbintensitäten, die

weniger als 12 γ entsprechen, werden die Ablesungen am Photometer ungenau; sind mehr als 90 γ IES im Bestimmungsgemisch vorhanden, so genügt einerseits die gewählte Kupfersulfatmenge nicht, um die maximale Farbintensität zu erreichen (s. S. 204), anderseits verursachen kleine Differenzen in der Schwefelsäurezugabe schon merkliche Fehler (s. S. 204).

2. Um bei Verwendung von Schwefelsäure DAB 6 die optimale Farbintensität zu erhalten, muß die nach Benedict (1909) hergestellte Lösung der Glyoxylsäure im Verhältnis 1 : 3,6 verdünnt werden (s. Fig. 2).
3. Um bei der Bestimmung derjenigen Wuchsstoffmengen, die normalerweise bei physiologischen Versuchen in Frage kommen, sicher die maximale Farbintensität zu erreichen, muß das Kupfersulfat (0,3 cc) in einer Konzentration von m/20 zugegeben werden; dies genügt gerade noch für 90 γ IES im Bestimmungsgemisch. Zudem ist auch die Menge des Kupfersulfates so gering genug, damit seine Eigenfarbe die Absorption der Lösung nur im langwelligen Gebiet verändert und die photometrische Messung (bei $\lambda =$ 5720 ÅE) also nicht beeinflußt wird.
4. Das Verhältnis zwischen dem Volumen der Schwefelsäure und der wässerigen Lösung (alle übrigen Reagenzien) muß bei der verwendeten konzentrierten Schwefelsäure (DAB 6) 7,0 : 5,0 betragen.
5. Wie schon Winkler (1934) hervorhob, ist es wichtig, daß die Lösungen während des Schwefelsäurezusatzes nicht lokal erhitzt und auch ständig gut durchmischt werden. Dies wird mit der auf S. 200 beschriebenen Apparatur leicht erreicht.
6. Die Farblösungen müssen bei Zimmertemperatur und innerhalb ein bis fünfzehn Stunden nach der Behandlung im Wasserbad kolorimetriert werden (s. S. 207).

Unter Einhaltung der in 1. bis 6. aufgestellten Bedingungen wird die Bestimmung der IES wie folgt ausgeführt:

Zu 3,0 cc β-Indolylessigsäurelösung (12 bis 90 γ) werden 0,3 cc m/20 Kupfersulfatlösung, 1,2 cc Glyoxylsäurelösung (nach Benedict, 1 : 3,6) und 0,5 cc Aqua dest. zugesetzt; das entstehende Gemisch wird in einer Kältemischung (—23 bis —18° C) gekühlt und dann unter ständigem Rühren aus Büretten tropfenweise 7,0 cc konzentrierte Schwefelsäure (DAB 6) zugegeben (zur Kühlung der Schwefelsäure läßt man diese langsam der Wand des gekühlten Reagensgefäßes entlang fließen) [1]. Nach Beendigung der Schwefelsäurezugabe wird das Durchmischen der Lösungen noch einige Minuten fortgesetzt. Dann wird das Gemisch eine Stunde bei Zimmertemperatur und im Dunkeln aufbewahrt

[1] Damit die Schwefelsäure genau abgemessen werden kann, wird sie nicht vorgekühlt in die Büretten eingefüllt (s. Seite 201).

und nun die Reagensgefäße 40 Minuten in ein Wasserbad von 65° C gebracht, wobei das Gemisch die violettrote Farbe annimmt. Ein bis fünfzehn Stunden nach der Wasserbadbehandlung (während dieser Zeit läßt man die Lösungen ebenfalls im Dunkeln bei Zimmertemperatur stehen) werden die Lösungen kolorimetriert (Stufen-Photometer, Filter S 57, Schichtdicke der Lösung 30 mm).

Die Aufnahme des Heteroauxins durch die Pflanze.

Es war meine Aufgabe, die Wuchsstoffaufnahme eines wachsenden pflanzlichen Organs und den Zusammenhang zwischen aufgenommener Menge Heteroauxin und der Wirkung auf das Wachstum zu untersuchen. Die Untersuchung wurde so durchgeführt, daß die durch die Pflanze verursachte Abnahme des Wuchsstoffgehaltes der Versuchslösung und die Wachstumsreaktion der Pflanze gemessen wurde. Diese Versuchsanordnung setzt allerdings voraus, daß aller aus der Lösung verschwundene Wuchsstoff tatsächlich von der Pflanze aufgenommen und nicht etwa bereits in der Lösung zerstört worden ist (s. hierzu S. 221 ff.).

Die Versuchspflanze *Cucumis sativus* und ihre Aufzucht.

Bei der Wahl des Versuchsobjekts mußte darauf geachtet werden, daß es in genügender Menge zu beschaffen, leicht aufzuziehen und sein Längenwachstum gut meßbar ist und vor allem, daß die IES in dem für die Bestimmungsmethode nach Winkler-Petersen geeigneten Konzentrationsbereich (10^{-5} bis 10^{-4} molar) wachstumsfördernd wirkt; Wurzeln sind deshalb ungeeignet (s. Geiger-Huber und Burlet, 1936). Wachsende Sproßorgane dagegen zeigen im allgemeinen noch bei hohen Wuchsstoffkonzentrationen eine Wachstumsförderung. Daher wählte ich für die Versuche Hypokotyle von *Cucumis sativus L.*[1] (Landgurken, grüne lange, volltragende. Samen : Ernte 1941, handelsübliche Qualität von F. Haubensack Söhne, Basel).

Normalerweise zeigen junge Keimstengel von Dikotylen eine haarnadelförmige Krümmung ihres obersten Teiles; etiolierte Keimpflanzen behalten diese meist bei, bis sie fast ausgewachsen sind. Da sich aber die Wachstumszone in dieser obersten Region befindet, so kann ihre Verlängerung bei gekrümmten Keimstengeln nur ungenau gemessen werden; verwendet man jedoch nur den geraden Teil, so wird bei der Entfernung der Kotyledonen der obere Teil der Wachstumszone weggeschnitten. Die Keimpflanzen von *Cucumis sativus* erwiesen sich nun in dieser Hinsicht als besonders günstig : Läßt man sie nämlich bei zirka

[1] Dieses Objekt scheint auch zum Studium anderer Wuchstofffragen geeignet zu sein; s. auch Kaufmann (1943).

24—25° C und 98—100 % Feuchtigkeit und im Dunkeln heranwachsen, so richten sich die Hypokotyle in manchen Fällen schon ganz auf, wenn sie eine Länge von 4—5 cm erreicht haben. Die hohe Luftfeuchtigkeit scheint nach meinen Beobachtungen für das Aufrichten ein wichtiger Faktor zu sein (vgl. auch Flury, 1933). Obwohl aber die Samen jedesmal gleich vorbehandelt und die Keimpflanzen vermeintlich immer unter denselben Bedingungen aufgezogen wurden, behielten die Hypokotyle einzelner Versuchsserien ihre Gipfelkrümmung manchmal doch bei. In solchen Fällen wurden die Keimpflanzen am Vortage des Versuchs ein bis zwei Stunden belichtet, worauf sie sich regelmäßig aufrichteten.

Die Torf-Sand-Mischung wurde vor der Aussaat der Samen sterilisiert, da die jungen Keimlinge häufig von einem Schimmelpilz befallen werden. Die Samen selbst wurden 25 Minuten mit einer 2 ‰-Bromlösung behandelt; daran anschließend ließ ich sie zwei Stunden im fließenden Wasser quellen. Die Keimfähigkeit der Samen wird durch diese Behandlung nicht beeinträchtigt. Sechs Tage nach der Aussaat sind die etiolierten, bei oben angegebener Temperatur und Feuchtigkeit aufgezogenen Keimlinge im Mittel zirka 8—11 cm hoch, so daß etwa 50 % davon in Länge und Ausbildung so gleichmäßig sind, wie es für die Versuche nötig ist. An den ausgesuchten Keimlingen wurden Kotyledonen und Wurzeln entfernt, dann die Hypokotylstücke in eine hinsichtlich Ionen « ausbalancierte » Lösung mit oder ohne Wuchsstoffzusatz gebracht und ihr Wachstum verfolgt; als Lösung (später immer Versuchslösung genannt) fand die hundertfach verdünnte, von Robbins (1922) modifizierte Pfeffersche Nährlösung Verwendung [1] (pH = 6,05).

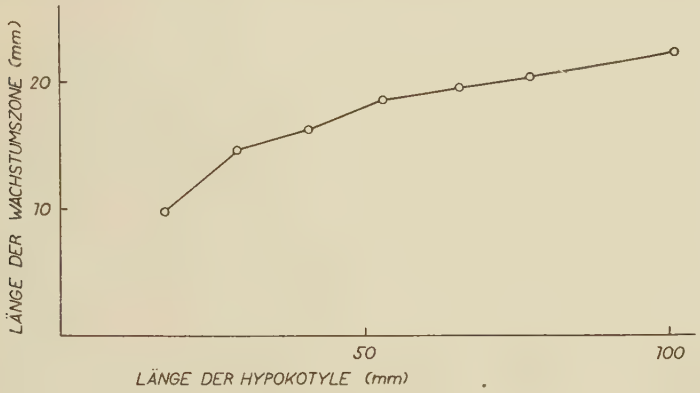
Das Wachstum des Hypokotyls von *Cucumis sativus*.

Der Zuwachs eines Hypokotylstückes ist während der ersten vierzehn Stunden nach dem Einlegen in die Versuchslösung (Temperatur 24° C) annähernd konstant und auch so groß, daß er bei Meßintervallen von zwei bis drei Stunden sicher festgestellt werden kann. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, zeigen zudem Hypokotyle mit einer Anfangslänge von 7—10 cm (Ansatz der Kotyledonen bis Wurzelhals) in der Versuchslösung alle denselben Zuwachs, kleinere Hypokotyle wachsen etwas langsamer. Aus diesem Grund wurden für die Versuche Stücke von 7—10 cm langen Hypokotylen verwendet.

Die Verteilung des Wachstums über die Länge des Hypokotyls entspricht nach meinen Untersuchungen derjenigen der Mehrzahl der Dikotylen-Keimlinge (z. B. Rothert 1896, Strugger 1934, Diehl,

[1] Zusammensetzung der unverdünnten Nährlösung (s. a. Burlet, 1940): 6000 cc destilliertes Wasser enthalten 2 g $Ca(NO_3)_2$, 0,5 g KH_2PO_4, 0,5 g KNO_3, 0,5 g $MgSO_4$, 0,25 g KCl und 0,005 g $FeCl_3$. Hinsichtlich Begründung der Verdünnung s. S. 217, hinsichtlich Volumen und Schichtdicke der Versuchslösung s. S. 219.

Gorter, van Iterson und Kleinhoonte 1939). Die Wachstumszone umfaßt die obersten 2—3 cm des Hypokotyls. Sie beginnt unmittelbar unterhalb des Ansatzes der Kotyledonen; die Zone stärksten Wachstums ist 4—6 mm von ihnen entfernt und verändert ihre Lage



Figur 10.

Abhängigkeit der Ausdehnung der Wachstumszone von der Länge (Alter) der Hypokotyle.

kaum mit dem Alter der Keimpflanze (ganz schwache Verschiebung nach unten). Bei älteren (längeren) Hypokotylen verteilt sich das Wachstum gleichmäßiger über die ganze Wachstumszone, die hier auch länger ist als bei jüngeren Pflanzen (Fig. 10). Trotz der längeren Wachstumszone nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit des Hypokotyls mit dem Alter ab, d. h. das Wachstum der einzelnen Zonen wird geringer, was auch Strugger (1934) bei *Helianthus annuus* feststellte.

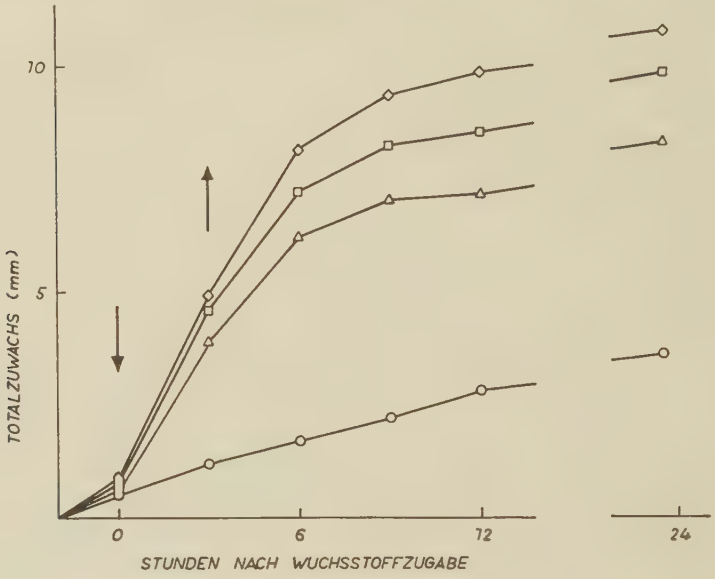
Tabelle 1.

Zuwachs der Hypokotyle verschiedener Anfangslänge in Versuchslösung bei 24° C.

Anfangslänge mm	Zuwachs in mm pro Std.
50	0,25
70	0,35
75	0,33
80	0,33
85	0,35
100	0,35

Es ist noch notwendig, die Wachstumsreaktion des Hypokotyls gegenüber Wuchsstoff zu prüfen, und zwar in dem für die Heteroauxinbestimmung in Frage kommenden Konzentrationsbereich ($1 \cdot 10^{-5}$ bis

$5 \cdot 10^{-4}$ molar IES). Wie Fig. 11 zeigt, wird das Wachstum von Hypokotylstücken, die sich während drei Stunden in Wuchsstofflösungen befanden, gegenüber dem Wachstum der Kontrolle (ohne Wuchsstoff !) stark gefördert; die Förderung nimmt mit steigender Konzen-



Figur 11.

Einfluß der Konzentration des Heteroauxins auf das Wachstum der Hypokotylstücke von *Cucumis sativus*.
Behandlungszeit : 3 Stunden.
↓ Beginn der Wuchsstoffbehandlung.
↑ Schluß der Wuchsstoffbehandlung.
○——○ Kontrolle.
△——△ $1{,}43 \cdot 10^{-5}$ molar.
□——□ $2{,}86 \cdot 10^{-5}$ molar.
◇——◇ $5{,}70 \cdot 10^{-5}$ molar.

tration zu. Bei noch höheren Konzentrationen, als sie in Fig. 11 angegeben sind, ist die Förderung nur wenig größer. Ähnliche Resultate erhält man auch, wenn bei gleichbleibender Konzentration die Behandlungszeit, d. h. die Zeit, während der sich die Hypokotylstücke in der Wuchsstofflösung befinden, verändert wird : Mit zunehmender Behandlungszeit (22 Minuten bis 6 Stunden) nimmt auch die Wachstumsförderung zu (s. a. Gast, 1942).

Das Wachstum der Hypokotylstücke wird also durch IES in Konzentrationen, wie sie bei meinen Versuchen über die Aufnahme des Heteroauxins verwendet werden, in allen Fällen gefördert. Da-

durch, daß sich bei verschiedenen Konzentrationen an IES resp. bei verschiedenen Behandlungszeiten auch Unterschiede in der Wirkung zeigen, ist eine für die Lösung der gestellten Aufgabe wichtige Voraussetzung erfüllt.

Die Bestimmung des Heteroauxins in der Versuchslösung

Bei der Bestimmung des IES-Gehaltes von Versuchslösungen, in denen sich Pflanzenteile befunden haben, muß damit gerechnet werden, daß durch die Versuchsanstellung bedingte oder aus den Versuchspflanzen stammende Stoffe in der Lösung vorhanden sind, welche die Farbreaktion stören können. In meinen Versuchen handelte es sich speziell darum, festzustellen, ob vielleicht Ionen der Nährlösung oder Stoffe aus den Hypokotylen von *Cucumis* die Bestimmung ungünstig beeinflussen.

Winkler (1934) erwähnt, daß Nitrate — überhaupt Anionen stark oxydierender Säuren — die Adamkiewicz-Hopkinssche Tryptophanreaktion stören. Nach meinen Versuchen gilt dies auch für die Farbreaktion der IES; das Absorptionsmaximum der Farblösung wird durch Anwesenheit von Nitrationen nach dem kurzwelligen Gebiet verschoben, und die Absorptionskurve wird viel flacher (s. Fig. 12). Außer den Nitrationen sind alle andern in der Pfeffer-Robbins-Nährlösung vorhandenen Ionen ohne Einfluß auf die Bestimmung. Da aber Nitrationen für die Pflanze notwendig sind, muß wenigstens dafür gesorgt werden, daß sie nicht in zu hohen Konzentrationen in das Bestimmungsgemisch gelangen[1]. Um dies zu erreichen, kann man die Nährlösung für die Versuche entsprechend verdünnen oder die Nitrationen vor der Bestimmung von der Lösung abtrennen. Für meine Versuche wurde die Nährlösung hundertmal verdünnt gegenüber ihrer gebräuchlichen Konzentration; ihr Salzgehalt ist dann 0,005 ‰, und 1 cc Lösung enthält noch 2,26 γ Nitrationen[2]. (Damit die Störung gerade nicht mehr auftreten würde, müßte die Nährlösung nur fünfundsiebzigmal verdünnt werden.)

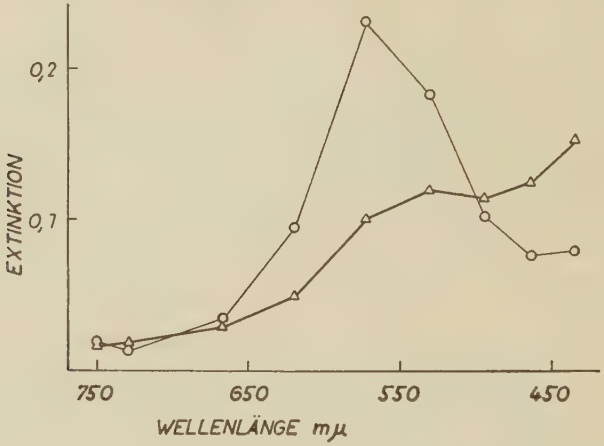
Weiter wurde festgestellt, daß während der längerdauernden Versuche (12—24 Stunden) von den Hypokotylen Stoffe an die umgebende Lösung abgegeben werden, die offenbar den Ausfall der Farbreaktion beeinflussen. Die Lösungen werden nach zirka 12 Stunden opaleszent, dann milchig trübe. Nach Zusatz von Wuchsstoff zu einer trüben Lösung wird bei seiner kolorimetrischen Bestimmung eine Abnahme festgestellt;

[1] Heteroauxin selbst wird durch Nitrationen nicht verändert; denn extrahiert man es z. B. mit Äther aus der Nährlösung, so wird es unverändert wieder gefunden.

[2] Es sei auch noch darauf aufmerksam gemacht, daß bei Verwendung von Leitungswasser an Stelle von Nährlösung nach meinen Versuchen auch dieses störend wirkt, sofern sein Gehalt an Nitrationen größer als etwa 3 mg pro Liter ist.

man muß daraus entweder auf eine Inaktivierung des Wuchsstoffes oder oder auf eine Störung der Reaktion schließen [1].

Da es nicht gelang, den störenden Stoff zu beseitigen, wurde der Ausweg gewählt, die Pflanzen nur s o l a n g e mit der Versuchslösung



Figur 12.

Absorptionskurve des durch Nitrat veränderten β-Indolylessigsäure-Farbstoffes im Vergleich mit der normalen Absorptionskurve.

△——△ 45 γ β-Indolylessigsäure mit 1 mg $Ca(NO_3)_2$ im Bestimmungsgemisch.

c——o 45 γ β-Indolylessigsäure im Bestimmungsgemisch.

in Berührung zu lassen, daß die ausgetretene Menge des störenden Stoffes (oder Stoffe) noch o h n e Einfluß bleibt. Dieser Grenzwert beträgt unter meinen Versuchsbedingungen (24° C, Schichtdicke der Versuchslösung zirka 3 mm, 40 Hypokotylstücke pro Versuch) s e c h s Stunden. Vorversuche zeigten, daß auch in dieser Zeit die Wuchsstoffaufnahme noch groß genug ist, um gemessen werden zu können. Für die Durchführung der Versuche ist wichtig, daß auch in diesem Falle der Wuchsstoff aus der Lösung e x t r a h i e r t werden muß; denn bei d i r e k t e r Verwendung der Versuchslösung für die Bestimmung wird der IES-Farbstoff verändert. Als Extraktionsmittel verwendete ich p e r o x y d f r e i e n Äther.

Spezielle Versuche über die Art der Extraktion ergaben :

1. Das Gleichgewicht der Verteilung von IES zwischen Äther und Wasser ist nach 30 Sekunden Schüttelzeit sicher erreicht (Tabelle 2).

[1] Meine speziell hierüber angestellten Versuche machen es wahrscheinlich, daß es sich dabei um eine Störung der *Farbreaktion* handelt.

Tabelle 2.

Abhängigkeit der extrahierten Menge IES von der Schüttelzeit.
Volumverhältnis Äther zu wässeriger Lösung 1 : 1.
Menge IES in 25 cc Lösung 1250 γ. Temperatur ca. 15° C.

Schüttelzeit Sekunden	Extrahierte Menge IES	
	in γ	in %
30	1240	99,3
60	1248	99,8
120	1248	99,8
150	1250	100,0

2. Ein dreimaliges Ausschütteln der wäßrigen Lösung mit je einem Viertel ihres Volumens an Äther genügt, um praktisch allen Wuchsstoff zu extrahieren (Tabelle 3). Wird nur einmal ausgeschüttelt, so werden etwa 70 % herausgeholt.

Tabelle 3.

Abhängigkeit der extrahierten Menge IES von der Zahl der Ausschüttelungen.
Volumverhältnis Äther zu wässeriger Lösung 0,25 : 1.
Menge IES in 20 cc Lösung 339 γ. Temperatur ca. 20° C.

Zahl der Ausschüttelungen	Extrahierte Menge IES	
	in γ	in %
2	329	97,4
3	340	100,4
4	337	99,6
5	347	102,6

3. Der Verteilungskoeffizient der IES zwischen Äther und Wasser wurde bei 20° C zu 20,1 $\pm$ 1,3 bestimmt (Dolk und Thimann, 1932, berechneten ihn bei 0° C zu 9,4).

Bei der Ausführung der Versuche wurden außer den oben erwähnten Umständen noch folgende Punkte berücksichtigt: Die Zahl der Hypokotylstücke muß so groß gewählt werden, daß das Material statistisch einheitlich ist (Fisher, 1938) und daß auch die Wuchsstoffabnahme der Lösung in den notwendigen, kurzen Versuchszeiten meßbare Werte erreicht. Das Volumen der Versuchslösung sollte möglichst klein sein, damit größtmögliche Differenzen in ihrem Heteroauxingehalt am Schlusse des Versuchs gegenüber der Anfangskonzentration erhalten werden. Außerdem muß die Schichtdicke der Lösung so gering sein, daß eine genügende Sauerstoffversorgung der Hypo-

kotylstücke gewährleistet wird. Die Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte führte zu folgender Versuchsanstellung :

Von Keimpflanzen geeigneter Länge (7—10 cm) werden die Kotyledonen direkt an ihrem Ansatz und die Wurzeln zirka 1—2 cm oberhalb des Wurzelhalses mit einem Rasiermesser abgeschnitten; die so erhaltenen Hypokotylstücke werden in Versuchslösung von etwa noch anhaftendem Torf und Sand gereinigt, dann gleichmäßig in Gruppen von je 40 Stück von 6—8 cm Länge verteilt, in Kristallisierschalen ($\varnothing = 10$ cm) mit 25 cc Versuchslösung (Schichtdicke zirka 3 mm) übertragen und für die ganze Dauer des Versuches in einen Thermostaten (24° C, dunkel) gestellt. Nach einer halben Stunde haben die Hypokotyle die Temperatur der Umgebung angenommen und können nun zum ersten Male gemessen werden [1]. Zwei Stunden später werden sie nochmals gemessen und in ein gleiches Volumen heteroauxinhaltige Versuchslösung übertragen (pH der Lösung je nach IES-Konzentration 4,1 bis 5,6). Nach einer geeigneten Versuchsdauer, die meistens 3 Stunden und nie mehr als 6 Stunden beträgt, wird die Heteroauxinlösung von den Hypokotylstücken abgegossen, die noch anhaftende Wuchsstofflösung dreimal gründlich mit Versuchslösung abgespült und daraufhin die Hypokotylstücke in neue Versuchslösung übergeführt, wo ihr Wachstum noch zirka 18 Stunden weiter verfolgt wird.

Die Extraktion des Heteroauxins mit Äther aus der mit der Spüllösung vereinigten Heteroauxinlösung wird folgendermaßen ausgeführt : Die Lösungen werden mit n/10 HCl angesäuert (1 cc HCl pro 10 cc Lösung), je viermal 45 Sekunden mit einem Viertel ihres Volumens peroxydfreiem [2] Äther ausgeschüttelt und die vereinigten Ätherfraktionen im Wasserbad bis fast zur Trockne destilliert. Um den restlichen Äther zu vertreiben, wird der Rückstand zum Lösen der IES mit kochendem [3] Aqua dest. aufgenommen und je nach der zu erwartenden Heteroauxinmenge auf das für die Bestimmung geeignete Volumen gebracht. Das Volumen der Bestimmungslösung darf aber nicht weniger als zirka ein Drittel desjenigen der Versuchslösung betragen, da sonst der störende Stoff zu stark angereichert wird.

Von den so erhaltenen Bestimmungslösungen werden je zwei Proben entnommen, deren Bestimmung mit der im ersten Teil der Arbeit ange-

[1] Auch wenn keine Wachstumsmessungen vorgenommen wurden, blieben die Hypokotylstücke vor der Zugabe der IES rund 2 Stunden in Nährlösung.

[2] Befreiung des Äthers von Peroxyden : Der Äther wird mit konzentrierter, wässeriger Ferrosulfatlösung geschüttelt, von der wässerigen Schicht getrennt, durch Schütteln mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann rektifiziert. Vor Gebrauch wird er regelmäßig mit Vanadinschwefelsäure oder Kaliumjodid auf Peroxydfreiheit geprüft (Brieger 1931, S. 554). Zur Gewinnung von besonders reinem Äther dient eine Methode von Riechel und Meister (1936).

[3] Kurzes Kochen zerstört das Heteroauxin nicht.

gebenen Methode getrennt durchgeführt wird. Neben den Versuchen wird stets ein Blindversuch ohne Hypokotylstücke, aber sonst unter den gleichen Bedingungen, ausgeführt und aus der Differenz zwischen dem Wuchsstoffgehalt dieser Kontrollösung und demjenigen der Versuchslösung die aus der Lösung verschwundene, d. h. von den Hypokotylstücken aufgenommene Wuchsstoffmenge ermittelt. Der Fehler der Bestimmung der aufgenommenen Wuchsstoffmenge wurde bereits im ersten Teil der Arbeit, S. 210, diskutiert.

Versuche über die Heteroauxinaufnahme durch *Cucumis sativus*.

a) Vorversuche.

Bei meiner Versuchsanordnung wird nur festgestellt, wieviel Wuchsstoff durch die Tätigkeit der Hypokotylstücke aus der Lösung verschwindet; es muß deshalb in erster Linie untersucht werden, ob die IES wirklich von der Pflanze aufgenommen worden ist.

Thimann (1934) beobachtete nämlich, daß während der Extraktion von zerkleinertem Pflanzenmaterial mit Wasser das Auxin, sehr wahrscheinlich durch frei gewordene Oxydasen, inaktiviert wird. Larsen (1936, 1940) untersuchte den Auxin- und Heteroauxin-inaktivierenden Stoff, der von verwundeten *Phaseolus*-Keimpflanzen an Agar abgegeben wird und der auch im Preßsaft der Keimlinge vorhanden ist. Seine Versuchsergebnisse machen die Annahme wahrscheinlich, daß es sich dabei um ein Oxydationsenzym handelt. Kornmann (1935), Fiedler (1936) und Gorter und Funke (1937) z. B. stellten an den Schnittflächen der verschiedensten Pflanzen und Pflanzenorgane eine Inaktivierung des Auxins fest. Es scheint demnach eine allgemein verbreitete Erscheinung zu sein, daß Auxin und Heteroauxin durch Stoffe, die aus verwundeten Pflanzenteilen austreten (wahrscheinlich Oxydationsenzyme) zerstört werden.

Es stellte sich nun die Frage, ob bei meinen Versuchen auch eine Zerstörung des Heteroauxins stattfindet und die aus der Lösung verschwundene Menge nicht oder nur zum Teil auf eine Wuchsstoffaufnahme zurückzuführen ist.

Wenn tatsächlich Hypokotylstücke von *Cucumis* während des Versuches wuchsstoffinaktivierende Stoffe, wie Oxydasen, an die Versuchslösung abgeben, so muß diese Lösung, nachdem die Hypokotyle aus ihr entfernt worden sind, noch die Fähigkeit besitzen, Wuchsstoff zu inaktivieren. Um dies zu prüfen, wurden Hypokotylstücke unter den üblichen Versuchsbedingungen drei Stunden in Versuchslösung gelegt und ihr nach Entfernung der Hypokotyle 1250 γ Heteroauxin zugesetzt. Vor der Aufarbeitung der Lösung für die Bestimmung des Wuchsstoffes wurde sie drei Stunden unter denselben Versuchsbedingungen stehen gelassen und nach dieser Zeit ein IES-Gehalt von 1260 γ, also 0.8 % zuviel, fest-

gestellt, d. h. daß der in der Außenlösung inaktivierte Anteil des Heteroauxins gering und nicht größer als der Fehler der Bestimmungsmethode sein kann.

Würde aber der Wuchsstoff etwa direkt an den Schnittflächen inaktiviert, so müßte der Wuchsstoffgehalt der Lösung entsprechend der steigenden Zahl der Schnittflächen abnehmen. Folgende Versuchsanstellung soll hierüber Auskunft geben : Es wurden drei Gruppen von je vierzig 8 cm langen Hypokotylstücken hergestellt; bei einer Gruppe wurden die Hypokotyle in vier, bei einer andern in zwei Teile geschnitten und bei der dritten ganz belassen. Alle übrigen Versuchsbedingungen, vor allem auch das Gesamtvolumen der Hypokotylstücke innerhalb der Versuchsreihe, wurden konstant gehalten. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis verschiedener solcher Versuche : Gleichgültig, wieviel Schnittflächen angebracht worden sind, verschwindet immer gleichviel Wuchsstoff aus der Lösung; die Werte sind nicht signifikant voneinander verschieden, wie aus den Angaben der Spalte 5 hervorgeht, die zeigen, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, daß die Werte in Spalte 3 signifikant different sind (Fisher 1938). Eine sichere Aussage über die Beeinflussung der IES-Aufnahme durch die Schnittflächen dürfte nur auf eine Wahrscheinlichkeit für die Signifikanz von mehr als 95 % gegründet werden (Burn 1937, Fisher 1938, Koller 1940).

Tabelle 4.

Aufnahme des Heteroauxins durch Hypokotylstücke mit verschiedener Zahl von Schnittflächen.
25 cc IES-Lösung; $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar (1250 γ).
Behandlungszeit 3 Stunden, Temperatur 24° C.

	Zahl der Schnittflächen	Verschwundene IES (in % von a)	Zahl der Versuche [1]	Signifikanz [2]
a	80	100 ± 0 %	5	a zu b : 39 %
b	160	96 ± 7,5 %	4	b zu c : 77 %
c	360	117 ± 14,4 %	4	c zu a : 72%

1 Alle Bestimmungen der IES wurden zudem im Doppel ausgeführt.
2 Die Berechnung der Signifikanz erfolgte absichtlich unter den für die zu beweisende Aussage ungünstigen Bedingungen.

Mit einer zweiten Gruppe von Versuchen sollte gezeigt werden, daß auch unverletzte Hypokotyle Wuchsstoff aufnehmen. Zu diesem Zwecke wurden die ganzen Keimpflanzen verwendet und derart in Petrischalen gelegt, daß nur die Hypokotyle in die Lösung eintauchten, die Wurzeln und Kotyledonen aber nicht mit ihr in Berührung kamen. Bei dieser Versuchsanstellung konnte aber die genaue Länge des eingetauchten Hypokotylteiles nicht festgestellt werden, da die Lösung zwi-

schen diesen kapillar aufsteigt; außerdem war es auch schwierig, die Wuchsstofflösung von den Keimpflanzen quantitativ abzuspülen. Obwohl diese Versuche daher nur qualitativ zu werten sind, ließ sich doch mit Sicherheit eine Aufnahme des Wuchsstoffes auch durch unverletzte Hypokotyle feststellen.

Als weitern Hinweis, daß die Schnittflächen die Menge der aus der Lösung verschwundenen IES nicht beeinflussen, soll ein Versuch angeführt werden, bei dem die Wuchsstoffaufnahme abgeschnittener mit derjenigen abgebrannter Hypokotylstücke verglichen wurde. Durch das Abbrennen mit dem Thermokauter (s. Burlet, 1940) werden die Zellen an der Trennungsfläche rasch abgetötet und die Enzyme wohl gänzlich zerstört. Wenn nun die Schnittflächen die Wuchsstoffabnahme der Lösung beeinflussen, so müssen sich zwischen der Wirkung der abgebrannten und jener er abgeschnittenen Hypokotylstücke Unterschiede ergeben. Wie aus Tabelle 5 deutlich hervorgeht, sind aber die Werte nicht signifikant voneinander verschieden (s. S. 210).

Tabelle 5.

Aufnahme des Heteroauxins durch abgeschnittene und abgebrannte Hypokotylstücke.
Gesamtvolumen der Hypokotylstücke 6,4 cc.
25 cc IES-Lösung; $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar (1250 γ).
Behandlungszeit 3 Stunden, Temperatur 24° C.

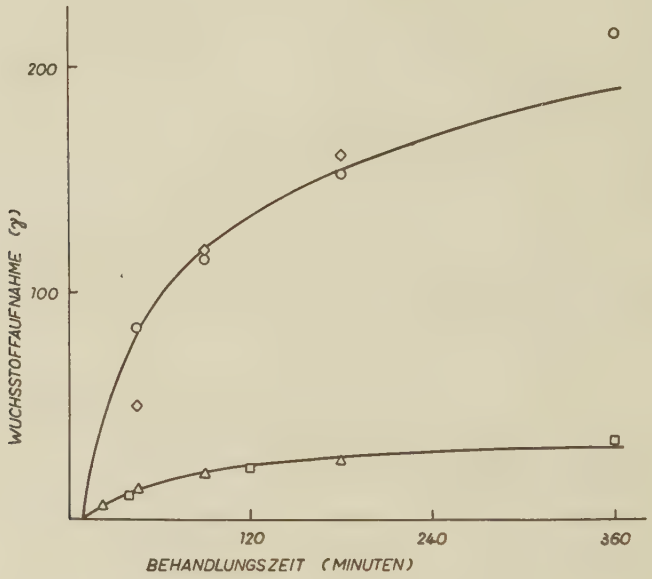
Behandlungsart	Zahl der Wundflächen	Verschwundene IES	
		in γ	in %
geschnitten	80	155,0	12,4
	160	155,0	12,4
gebrannt	80	152,5	12,2
	160	147,5	11,8

Die hier beschriebenen Versuche zeigen also, daß die IES unter meinen Versuchsbedingungen weder durch an die Lösung abgegebene Stoffe noch direkt an den Schnittflächen in meßbarer Menge inaktiviert wird und daß demnach die aus der Lösung verschwundene Wuchsstoffmenge sicher als von den Hypokotylstücken aufgenommen betrachtet werden darf.

b) Hauptversuche.

Wie aus den Versuchen anderer Autoren hervorgeht (Albaum, Kaiser und Nestler 1937, Geiger-Huber 1938, Skoog 1938, Gast 1942), sind Wuchsstoffkonzentration und Behandlungszeit besonders wichtige Faktoren für die Größe der Wuchsstoffaufnahme; dies war auch in meinen Versuchen der Fall.

Wie Fig. 13 zeigt, nimmt die Geschwindigkeit, mit welcher der Wuchsstoff aus einer r u h e n d e n Lösung aufgenommen wird, mit der Versuchsdauer, d. h. Behandlungszeit, rasch ab. Durch Extrapolation aus den Kurven läßt sich ermitteln, daß nach zirka 9 Stunden die Aufnahme



Figur 13.

Abhängigkeit der Heteroauxinaufnahme von der Behandlungszeit.

Anfangskonzentration der Außenlösung:

△———△ Versuch V 30 } $5{,}70 \cdot 10^{-5}$ molar.
□———□ Versuch V 41 }

○———○ Versuch V 54 } $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar.
◊———◊ Versuch V 55 }

praktisch aufhört und sich zu dieser Zeit ein Gleichgewicht zwischen der aufgenommenen und der in der Außenlösung verbleibenden IES einstellt. Die zur Erreichung dieses Gleichgewichts notwendige Menge aufgenommener IES für 40 Hypokotyle von 5 cc Gesamtvolumen ist bei diesen Versuchen für eine Anfangskonzentration von $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar 230 γ, für $5{,}7 \cdot 10^{-5}$ molar 35 γ. Bei den normalerweise von mir angewendeten Behandlungszeiten von drei und sechs Stunden werden 75 % resp. 94 % der Gleichgewichtskonzentration erreicht. Bezieht man bei allen solchen Versuchen die Wuchsstoffmenge, die bei Gleichgewicht aufgenommen würde (in meinen Versuchen aus technischen Gründen nicht bestimmbar, vgl. S. 218, und nur durch Extrapolation erhalten), auf den Wassergehalt (97.5 %) der Hypokotylstücke, so erhält man die

Tabelle 6.

Gleichgewichtskonzentration des Heteroauxins in Versuchslösung und Hypokotylstücken.
Mittelwerte aus unter sich vergleichbaren Versuchen.
Volumen der Hypokotylstücke 5—7 cc.
25 cc IES-Lösung, Temperatur 24° C.

	Angewendete Konzentration	Gleichgewichtskonzentration (γ pro cc)		Zahl der Versuche
		in Versuchslösung	im Hypokotyl	
a	$5{,}7 \cdot 10^{-5}$ molar = 10 γ pro cc	$8{,}1 \pm 0{,}3$	$8{,}0 \pm 0{,}9$	5
b	$2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar = 50 γ pro cc	$42{,}0 \pm 0{,}5$	$38{,}9 \pm 3{,}1$	18
b : a	5,0	5,18	4,86	

in Tabelle 6 angegebenen Konzentrationen im Hypokotyl resp. in der Versuchslösung; die Unterschiede sind, wie die Rechnung zeigt (z. B. Burn 1937, Fisher 1938) nicht signifikant. Bei Gleichgewicht wird also im Innern der Gewebe, bezogen auf ihr Volumen an Wasser, dieselbe Konzentration erreicht, wie sie in der Außenlösung vorhanden ist[1]. Dasselbe stellten Albaum, Kaiser und Nestler (1937) bei Zellen von *Nitella* fest, und sie schlossen daraus und aus dem zeitlichen Verlauf der Wuchsstoffaufnahme, daß es sich um einen einfachen Diffusionsprozeß handeln muß. Aus der dritten Zeile in Tabelle 6, die die Verhältniszahlen aus den Versuchsreihen a und b angibt, ist auch zu entnehmen, daß das Verhältnis der Konzentrationen in der Außenlösung resp. im Hypokotyl gleich bleibt wie bei den gebotenen Anfangskonzentrationen; dasselbe gilt auch für höhere Wuchsstoffkonzentrationen ($5{,}7 \cdot 10^{-4}$ molar). Die theoretisch größtmögliche Menge IES, die durch Diffusion von 1 cc Hypokotylstücken bei 24° C aufgenommen resp. gelöst gehalten werden könnte, ist 3,10 mg entsprechend der festgestellten Löslichkeit der IES in Wasser bei 24° C von 3,18 g/l.

Trägt man für die in Fig. 13 dargestellten Kurven die Werte für die Behandlungszeit in einem logarithmischen Maßstab auf, so erhält man zwei Gerade. Die wahrscheinlichste Lage dieser Geraden wurde mit Hilfe des Regressionskoeffizienten (Pütter, 1929) für $5{,}70 \cdot 10^{-5}$ molar zu $24{,}0 \pm 0{,}17$ und für $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar zu

[1] Bei dem in Figur 13 eingezeichneten Versuch mit $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar IES ist die am Schlusse des Versuches im Hypokotyl erreichte Heteroauxinkonzentration allerdings größer als die Anfangskonzentration der Lösung. Da die Streuung der Werte dort groß ist, kommt diesem Ergebnis aber keine reelle Bedeutung zu.

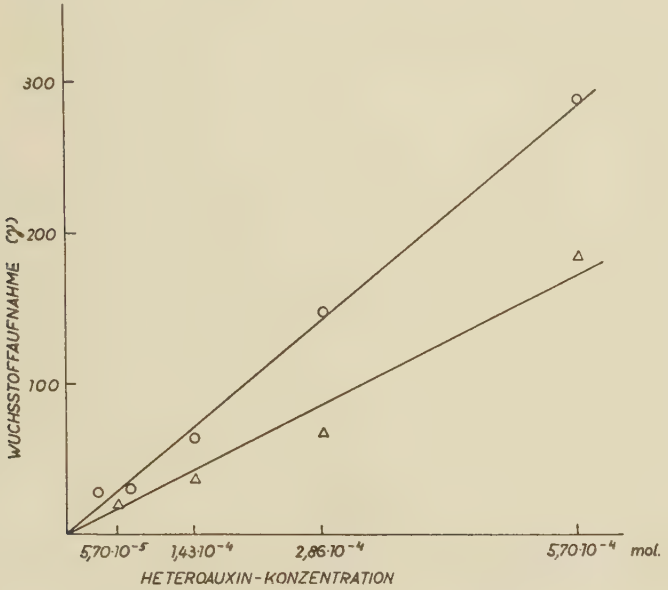
113,4 ± 17,6 berechnet und daraus wieder die in Fig. 13 eingezeichneten Kurven konstruiert. Aus diesen geht auch hervor, daß sich die Abhängigkeit der Wuchsstoffaufnahme von der Behandlungszeit bei verschiedenen Konzentrationen qualitativ nicht ändert, der Kurventypus bleibt derselbe. Vergleicht man die Regressionskoeffizienten der beiden Kurven miteinander, so fällt auf, daß sie sich ungefähr gleich wie die entsprechenden Konzentrationen, nämlich wie 1 : 5 verhalten. Wenn man berücksichtigt, daß die Versuche nicht gleichzeitig ausgeführt wurden, ist die Übereinstimmung der beiden Quotienten gut.

Versuche, bei denen bei einer bestimmten Behandlungszeit die IES-Konzentration verändert wurde, ergaben, wie Fig. 14 zeigt, daß die Aufnahme der Konzentration direkt proportional ist. Dies gilt auch, wie nach den Versuchen über den Einfluß der Behandlungszeit erwartet werden mußte, wenn das Gleichgewicht noch nicht erreicht ist, da ja die eintretende relative Wuchsstoffmenge nur durch die Behandlungszeit, nicht aber durch die Konzentration bestimmt wird, d. h. daß in jedem Zeitpunkt ein bestimmter Prozentsatz der in der Außenlösung gerade vorhandenen Wuchsstoffmenge eindringt. Hingegen ist die absolute Menge von Konzentration und Behandlungszeit stark abhängig. Diese Resultate sind in guter Übereinstimmung mit denen anderer Autoren, die biologische Teste benützten (Thimann und Bonner 1932, Skoog 1936, Gast 1942). Es muß jedoch beachtet werden, daß es sich bei den Versuchen von Thimann und Bonner (1932) um den Übertritt des Wuchsstoffes aus einem Agarwürfel in die *Avena*-Koleoptile, und zwar an der Schnittfläche handelt, während bei meinen Versuchen der Wuchsstoff aus der umgebenden Lösung vom ganzen Hypokotylstück aufgenommen wird.

Verschiedene Beobachtungen während der Versuche ließen vermuten, daß das Reaktionsvolumen für die Wuchsstoffaufnahme eine Rolle spielt, darum wurde sein Einfluß speziell untersucht. Unter Reaktionsvolumen verstehe ich das einer Volumeinheit (1 cc) Hypokotylstücke zur Verfügung stehende Volumen der Heteroauxinlösung; es wird also durch den Quotienten aus dem Volumen der Lösung und demjenigen der Hypokotylstücke ausgedrückt. Es gibt zwei Möglichkeiten, diesen Quotienten zu variieren: entweder läßt man das Volumen der Hypokotylstücke [1] konstant und variiert dasjenige der Versuchslösung, das Verhältnis zwischen diesen beiden Größen entspricht dem absoluten Reaktionsvolumen; oder man läßt das Volumen der Lösung konstant und variiert dasjenige der Hypokotylstücke und erhält so die Veränderung des relativen Reaktionsvolumens.

[1] Unter dem Volumen der Hypokotylstücke ist immer das Gesamtvolumen aller vierzig Hypokotylstücke verstanden, die in ein Versuchsgefäß eingetragen werden.

Wenn die Hypokotylstücke aus der umgebenden ruhenden Lösung Wuchsstoff aufnehmen, wird sich die Konzentration in ihrer unmittelbaren Nähe erniedrigen; das bedeutet, daß nun entsprechend weniger Wuchsstoff aufgenommen wird. Dieser Vorgang muß sich um so mehr bemerkbar machen, je weniger Lösung vorhanden ist.



Figur 14.

Abhängigkeit der Wuchsstoffaufnahme von der Anfangskonzentration des Heteroauxins in der Versuchslösung.

Behandlungszeit: △——△ 90 Minuten. ○——○ 180 Minuten.

Um nun den Einfluß des absoluten Reaktionsvolumens zu untersuchen, variierte ich das Volumen der Versuchslösung zwischen 6 und 75 cc. Durch die Wahl geeigneter Versuchsgefäße wurde für alle Volumina die gleiche Schichtdicke der Lösung, nämlich zirka 3 mm, erreicht, um überall gleiche Verhältnisse in bezug auf den Gasaustausch der Hypokotyle zu gewährleisten. Die Versuche wurden mit je 40 Hypokotylstücken von 4 cm Länge (d. h. einem Volumen von 3,65 cc), einer Behandlungszeit von 3 Stunden und IES-Konzentration von $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar bei 24° C ausgeführt. Für alle Versuche dieser Art wurden nur die ausgewachsenen Teile der Hypokotyle verwendet. Durch Vorversuche war zwar festgestellt worden, daß die Hypokotyle in ihrer ganzen Ausdehnung überall gleichviel Wuchsstoff aufnehmen; es wurde aber trotzdem darauf geachtet, daß die einzelnen Zonen des Hypokotyls in allen Versuchsgruppen gleichmäßig vertreten waren. Um die Versuche

über den Einfluß des absoluten und des relativen Reaktionsvolumens miteinander vergleichen zu können, wurde die Wuchsstoffaufnahme in allen Fällen auf ein Volumen der Hypokotylstücke von 1 cc bezogen.

In Fig. 15 ist zu sehen, daß die Aufnahme des Wuchsstoffes, wie zu erwarten war, mit steigendem Reaktionsvolumen z u n i m m t. Dasselbe

Figur 15.

Einfluß des Reaktionsvolumens auf die Wuchsstoffaufnahme.

Anfangskonzentration des Heteroauxins: $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar.

a) Volumen V_L der Versuchslösung variiert von 6—75 cc.
Volumen V_H der Hypokotylstücke konstant = 3,65 cc.
Behandlungszeit: 180 Minuten □— — —□

b) Volumen V_L der Versuchslösung konstant = 25 cc.
Volumen V_H der Hypokotylstücke variiert von 0,1—7,3 cc.
Behandlungszeit: { 180 Minuten △———△
360 Minuten ○———○

mußte sich auch bei einer Veränderung des relativen Reaktionsvolumens ergeben, wie ebenfalls Fig. 15 zeigt. Bei diesen Versuchen wurden die Volumina der Hypokotylstücke von 0,1—7,3 cc (das entspricht je vierzig Hypokotylstücken von 1—80 mm Länge) variiert, eine Konzentration von $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar IES und Behandlungszeiten von drei und sechs Stunden gewählt. Es kommt also im Prinzip auf dasselbe hinaus, ob das absolute oder das relative Reaktionsvolumen verändert wird : In beiden Fällen sinkt die Wuchsstoffaufnahme mit abnehmendem Reaktionsvolumen resp. zunehmendem Volumen der Hypokotylstücke stark ab. Dieselben Gesetzmäßigkeiten konnte auch Musfeld (1942) für die Aufnahme des Zuckers durch Hefezellen beobachten.

Hier mag auch noch das Ergebnis orientierender Versuche über den Einfluß des Lichtes auf die Wuchsstoffaufnahme angeschlossen werden. Von drei gleichen Gruppen von Hypokotylstücken wurde eine während des ganzen Versuches dunkel gestellt, eine zweite einer Belichtung von 50 Lux (Aarau-Lampe, 25 W) und die dritte einer solchen von 5000 Lux (Luxram-Lampe, 300 W) ausgesetzt. Die Versuchsschalen wurden von unten her belichtet, um ein Aufkrümmen der Hypokotyle aus der Lösung zu verhindern. Damit sich die Lösungen mit den Pflanzen bei der starken Belichtung von 5000 Lux nicht erwärmten, wurde zwischen die Lichtquelle und die Schale mit den Hypokotylstücken eine Küvette eingeschaltet, durch die Wasser gerade so schnell hindurchströmte, daß die Temperatur der Wuchsstofflösung dauernd auf 24° C blieb. Die belichteten Hypokotylstücke wurden vor und nach der Wuchsstoffbehandlung dunkel gestellt.

Tabelle 7.

Aufnahme des Heteroauxins bei verschiedener Lichtintensität.
Länge der Hypokotylstücke 60 mm.
25 cc IES-Lösung; $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar (1250 γ).
Behandlungszeit 90 Minuten, Temperatur 24° C.

Lichtintensität Lux	Aufgenommene IES	
	in γ	in %
dunkel	67,5	5,4
50	75,0	6,0
5000	57,5	4,6

Tabelle 7 zeigt, daß das Licht in dem untersuchten Wellenlängen- und Intensitätsbereich die Wuchsstoffaufnahme kaum beeinflußt, denn angesichts der geringen aufgenommenen Wuchsstoffmengen müssen die Differenzen als nicht signifikant betrachtet werden (s. S. 210). Ebensowenig konnte eine Lichtwachstumsreaktion festgestellt werden : das

Wachstum war in allen Fällen genau dasselbe; auch die Wachstums kontrollen ohne Wuchsstoff reagierten nicht auf die Belichtung.

Theoretische Betrachtungen und Modellversuche.

Aus allen bis jetzt mitgeteilten Versuchen über die Aufnahme des Wuchsstoffes geht deutlich hervor, daß es sich bei diesem Vorgang um einen reinen Diffusionsvorgang handelt, bei dem der Wuchsstoff sich zwischen Außenlösung und Hypokotyl entsprechend einem « Verteilungskoeffizienten » von ungefähr 1 verteilt. Dies wird auch durch die Tatsache noch unterstrichen, daß die Absolutbeträge der durch die Hypokotyle aufgenommenen Wuchsstoffmengen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen stets ungefähr gleich groß sind. Aus sieben unter sich gleichen Versuchsreihen, die mit einer IES-Konzentration von $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar (1250 γ pro 25 cc) und einer Behandlungszeit von drei Stunden ausgeführt wurden, ergab sich für 40 Hypokotylstücke z. B. eine mittlere Aufnahme von $140 \pm 9{,}9$ γ; die Schwankungen sind also klein. Es wurde im Laufe der Untersuchung keine Beobachtung gemacht, wonach die Wuchsstoffaufnahme in das Hypokotyl einer Adsorption oder einer « adenoiden Tätigkeit » zugeschrieben werden müßte. Wenn solche Vorgänge schon stattfinden, dann werden sie durch den reinen Diffusionsvorgang quantitativ völlig überdeckt. (Die Frage der Adsorption des Wuchsstoffes an den Reaktionsorten der Zelle wird später behandelt, S. 237.)

Es ist nun noch nötig, den Vorgang der Wuchsstoffaufnahme in Beziehung zu bringen zu den wichtigsten physiologischen Erscheinungen, wie Wuchsstoffverbrauch oder Wuchsstoffinaktivierung im lebenden Gewebe. Es ist nämlich anzunehmen, daß das weitere Verhalten des Wuchsstoffes in der Pflanze sich auch in seiner Aufnahme geltend machen muß. Der Vorgang muß z. B. anders verlaufen, wenn sämtlicher aufgenommene Wuchsstoff in der Pflanze fortwährend wieder zerstört wird, als wenn er in der Zelle frei gelöst bleibt. Ich versuchte deshalb in erster Linie, an Hand der mitgeteilten Versuchsresultate und einiger eigens dafür angestellter Versuche, die im folgenden noch besprochen werden, die Größe eines eventuellen Verbrauchs oder Zerstörung (Inaktivierung) des aufgenommenen Wuchsstoffes innerhalb der Zelle, resp. des Gewebes, abzuschätzen.

Es sind aus der Literatur verschiedene Tatsachen bekannt, welche eine Inaktivierung des Wuchsstoffes in der Pflanze wahrscheinlich machen. So stellten z. B. Went (1929), van der Weij (1932), van Overbeek (1933, 1935), Bonner und Thimann (1935) und Jahnel (1937) fest, daß weder mit der Agarabfangmethode noch durch Extraktion der den Versuchspflanzen gebotene Wuchsstoff quantitativ wieder gefunden werden kann. Geiger-Huber und Burlet (1936)

und Jost und Reiß (1936) beobachteten, daß die Wachstumshemmung von Wurzeln in hemmenden Wuchsstofflösungen mit zunehmender Versuchsdauer abnimmt und schließen daraus auf einen Verbrauch, eine Zerstörung oder doch eine Fixierung des Wuchsstoffes (Geiger-Huber und Burlet 1936). Auch der von Gast (1942) festgestellte Ablauf der Wachstumsreaktion bei Maiswurzeln auf kurzfristige Wuchsstoffgaben kann kaum anders als durch eine Inaktivierung des Wuchsstoffes gedeutet werden. Aber gerade aus seinen Versuchen muß man schließen, daß es sich dabei nur um äußerst geringe Mengen inaktivierten Wuchsstoffes handeln kann. Auch den Versuchen von Hitchcock und Zimmerman (1938, S. 507) ist zu entnehmen, daß nur wenig Heteroauxin in der Pflanze zerstört wird. Die beiden Verfasser konnten mit der Methode Winkler und Petersen (1935) noch mehrere Tage nach der Heteroauxinbehandlung in den Versuchspflanzen (*Tomaten, Gladiolus, Lonicera*) IES oder doch wenigstens einen intakten Indolkern feststellen. Ein Extrakt, der eine Farbreaktion gab, war auch biologisch noch aktiv. Da diese Methode mit ihrer für physiologische Konzentrationen geringen Empfindlichkeit in diesem Falle noch angesprochen hat, können sicher nicht große Mengen Heteroauxin inaktiviert worden sein.

Bei dem Bemühen, die Wuchsstoffwirkung zu erklären, wurde auch versucht, die Wuchsstoffinaktivierung in eine direkte Beziehung zum Wachstum zu bringen. Went (1929) spricht auf Grund seiner Versuchsergebnisse mit *Avena* die These aus, daß der Wuchsstoff durch das Wachstum verbraucht werde und daß die Wachstumsgröße von der im Gewebe vorhandenen Wuchsstoffmenge abhängig ist. Auch Dijkmann (1934) gelang es, an Hypokotylen von *Lupinus* das Wachstum in eine quantitative Beziehung zum vorhandenen Wuchsstoff zu bringen. Bonner und Thimann (1935) stellten für niedrige Wuchsstoffkonzentrationen eine Proportionalität zwischen inaktivierter Wuchsstoffmenge (Heteroauxin) und dem Wachstum fest; bei hohen Konzentrationen ist die Inaktivierung aber wesentlich größer als dem Wachstum entspricht, und zudem wird auch Wuchsstoff inaktiviert, wenn das Wachstum vollständig verhindert wird.

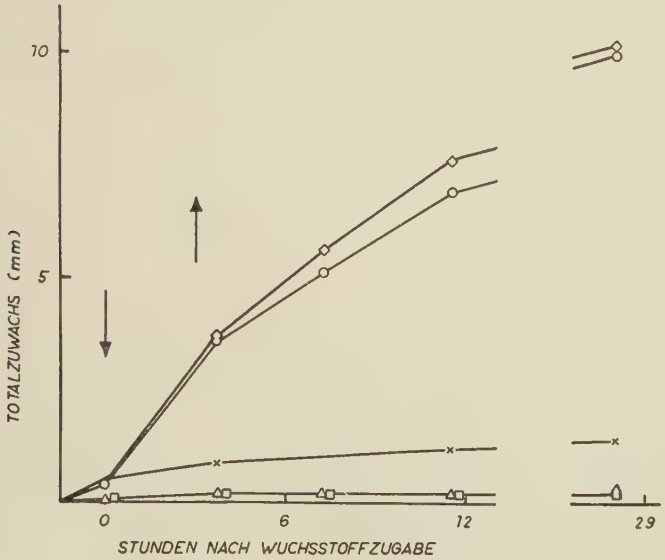
Wenn man annehmen darf, daß die Pflanze so lange Wuchsstoff aus der Umgebung aufnimmt, bis ein Gleichgewicht erreicht ist, so muß die Aufnahme mit abnehmendem Konzentrationsgefälle sich verlangsamen und schließlich aufhören, wenn der Wuchsstoff in der Pflanze nicht fortwährend wieder zerstört wird. Findet aber eine Inaktivierung statt, so wird sich das Gleichgewicht nie einstellen können, da die Orte, wo der Wuchsstoff angereichert wird, immer wieder von diesem frei werden und neue Wuchsstoffmoleküle eingelagert werden können — es sei denn, daß das Inaktivierungsprodukt die Aufnahmefähigkeit der Pflanze für Wuchsstoff herabsetze.

Wie die auf S. 224 beschriebenen Versuche ergaben, nimmt die Aufnahmegeschwindigkeit des Wuchsstoffes mit der Versuchsdauer rasch ab und wird schließlich annähernd null (s. Fig. 13). Diese rasche Abnahme der Aufnahmegeschwindigkeit mit der Zeit macht es wahrscheinlich, daß tatsächlich nur sehr wenig IES in der Pflanze inaktiviert oder verbraucht wird; denn sonst könnte sich kein Gleichgewicht einstellen. In dem Grenzfall nämlich, wo aller aufgenommene Wuchsstoff sofort inaktiviert würde, müßte die Aufnahme bis zur Erschöpfung der Außenlösung an IES weitergehen.

Um nachzuweisen, daß Heteroauxin in den behandelten Hypokotylen wirklich noch vorhanden ist, extrahierte ich die Hypokotylstücke nach dem Versuch mit Äther und analysierte den gewonnenen Extrakt mit der im ersten Teil, Seite 212, angegebenen Bestimmungsmethode. Wie zu erwarten war, wurde aber die Farbreaktion gestört, obwohl der Ätherextrakt nach Boysen-Jensen (1940), Methode I, gereinigt worden war. Da aber mit einem Extrakt aus unbehandelten Hypokotylstücken keine Farbreaktion, mit demjenigen der behandelten hingegen die rötlich-gelbe Farbe erhalten wurde, wie sie bei der Störung der Reaktion durch Nitrat oder andere störende Stoffe eintritt (s. S. 217 ff.), kann doch mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit von IES geschlossen werden.

Weiter muß entschieden werden, ob der Wuchsstoff durch das Wachstum verbraucht wird oder nicht. Findet ein größerer Verbrauch statt, so muß sich dies nach obiger Überlegung (S. 231) ebenfalls in einer vermehrten Wuchsstoffaufnahme der wachsenden Organe gegenüber nicht wachsenden äußern. Die Hypokotyle von *Cucumis* stellen für diese Untersuchung ein günstiges Objekt dar, da die Wachstumszone relativ kurz ist und so von ein und demselben Hypokotyl gleich lange Stücke, die sicher die ganze Wachstumszone umfassen, mit solchen, die nur aus ausgewachsenem Gewebe bestehen, in ihrem Verhalten direkt miteinander verglichen werden können. Von 9 cm langen Hypokotylen verwendete ich für den Versuch die drei obersten Zentimeter — also die Wachstumszone (s. S. 215) — und die drei untersten Zentimeter, die sicher ausgewachsen sind, und brachte sie in je 25 cc Lösung von $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar IES. Nach drei Stunden wurde die Wuchsstoffabnahme der Lösung gemessen. Während des Versuches wurde auch das Wachstum der Hypokotylstücke verfolgt (Fig. 16). In Tabelle 8 sind die Werte für die Wuchsstoffaufnahme aus je zwei unter denselben Bedingungen ausgeführten Versuchen (*a* und *b*) wiedergegeben: wachsende und nicht wachsende Hypokotylstücke nehmen gleichviel Wuchsstoff aus der umgebenden Lösung auf. Daß es sich tatsächlich um wachsende und ausgewachsene Hypokotylstücke gehandelt hat, beweist Figur 16. Die wachsenden Teile wurden in ihrem Wachstum gegenüber der Kontrolle ohne Wuchsstoff durch IES stark

gefördert, während die ausgewachsenen nur eine kaum meßbare Wachstumsanregung erfuhren. Würden beträchtliche Mengen Wuchsstoff durch das Wachstum verbraucht, so hätten sich diese großen Wachstumsunterschiede (zirka 2000 %, s. Fig. 16) auch in der Wuchs-



Figur 16.

Einfluß des Heteroauxins auf das Wachstum wachsender und ausgewachsener Hypokotylstücke.
Heteroauxinkonzentration : $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar.
Behandlungszeit : 3 Stunden.

○——○ Versuch a } wachsend mit Wuchsstoff.
◊——◊ Versuch b }
×——× Kontrolle : wachsend ohne Wuchsstoff.
△——△ Versuch a } ausgewachsen mit Wuchsstoff.
□——□ Versuch b }
↓ Beginn der Wuchsstoffbehandlung.
↑ Schluß der Wuchsstoffbehandlung.

(Die Kontrolle « ausgewachsen ohne Wuchsstoff » ist nicht eingezeichnet, da Zuwachs = 0.)

stoffaufnahme geltend machen müssen; der durch das Wachstum verbrauchte Wuchsstoff kann also nur einen Bruchteil des aufgenommenen ausmachen. Dies beweist wiederum, daß die Wuchsstoffaufnahme ein passiver Vorgang ist und nicht durch ein Wuchsstoffbedürfnis der Pflanze geregelt wird (s. S. 230).

Nach den oben beschriebenen Versuchsergebnissen muß eine Inaktivierung des Wuchsstoffes in größerem Umfange als sehr unwahr-

Tabelle 8.

Aufnahme des Heteroauxins durch wachsende und ausgewachsene Teile des Hypokotyls.

Länge der einzelnen Zonen 3 cm.
25 cc IES-Lösung, $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar (1250 γ pro 25 cc).
Behandlungszeit 3 Stunden, Temperatur 24° C.

Hypokotyl-Zone	Versuch	Aufgenommene IES	
		in γ	in %
Wachstumszone	a	120,0	9,6
	b	122,5	9,8
ausgewachsene Zone	a	120,0	9,6
	b	120,0	9,6

scheinlich angesehen werden. Es fragt sich nun, ob noch weitere Vorgänge und Bedingungen für die Heteroauxinaufnahme von Bedeutung sind.

Da für das Eindringen eines Stoffes in die Zelle unter anderm auch der Lipoidgehalt der Protoplasma-Membranen sicher von Bedeutung ist (z. B. Collander 1937), wurde zunächst der Verteilungskoeffizient der IES zwischen Wasser und Lipoiden, nämlich zwischen Arachisöl und Wasser, resp. Olivenöl und Wasser bestimmt: 15 cc Heteroauxinlösung von $3{,}75 \cdot 10^{-5}$ bis $2{,}86 \cdot 10^{-4}$ molar wurden mit je 5 cc Öl 15 Minuten[1] bei 13° C (Olivenöl 20° C) geschüttelt und der Wuchsstoff nach der Trennung der beiden Phasen durch Zentrifugieren in der wäßrigen Schicht kolorimetrisch bestimmt (s. Tab. 9).

Im Anschluß an die orientierenden Versuche von Ruge (1937) wurde auch die Verteilung der IES zwischen Ölsäure und Wasser resp. einem Gemisch von Olivenöl und Ölsäure (im Verhältnis 1 : 1) und Wasser untersucht[2]. Das Volumverhältnis wäßrige Lösung zu Lipoid war in diesen Versuchen 15 : 2. Für den Verteilungskoeffizienten zwischen dem Öl-Ölsäure-Gemisch und Wasser bei einer IES-Konzentration von $5{,}70 \cdot 10^{-4}$ molar ergab sich der Wert 7,25; für Ölsäure beträgt das Verhältnis bei dieser Konzentration (100 γ/cc) 5,9, für Olivenöl 0,83 (Tabelle 9); d. h. daß die Löslichkeit der IES in diesem Gemisch größer ist als in jeder der beiden Komponenten.

Berücksichtigt man den *Dissoziationsgrad* der IES, der entsprechend dem pH bei den einzelnen Konzentrationen ändert und bezieht die in

[1] Vorversuche zeigten, daß das Gleichgewicht der Verteilung in 15 Minuten sicher erreicht ist.

[2] Da die in der wässerigen Schicht verbleibenden kleinen Mengen von Ölsäure die Reaktion schwach stören, müssen diese Werte als Höchstwerte betrachtet werden.

Tabelle 9.

Verteilung der IES zwischen Lipoid und Wasser.
Temperatur 13° C.
$c_1 = \gamma$ IES pro cc Lipoid, $c_2 = \gamma$ IES pro cc Wasser.

Konzentrierte IES γ/cc	Arachisöl			Olivenöl[1]			Ölsäure			Ölsäure + Olivenöl		
	c_1	c_2	$\frac{c_1}{c_2}$	c_1	c_2	$\frac{c_1}{c_2}$	c_1	c_2	$\frac{c_1}{c_2}$	c_1	c_2	$\frac{c_1}{c_2}$
100	—	—	—	64,8	78,4	0,83	329	56	5,9	369	50,8	7,25
50	—	—	—	38,4	37,2	1,03	241	18	13,6	—	—	—
25	10,2	21,7	0,49	15,0	20,0	0,75	—	—	—	—	—	—
12,5	7,5	10,0	0,75	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6,25	4,7	4,7	1,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—

[1] Temperatur 20° C.

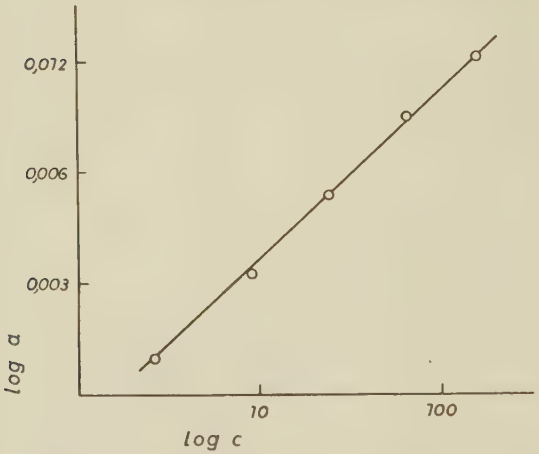
das Lipoid übergegangene Menge IES auf den undissozierten Anteil, so ergibt sich für den Verteilungskoeffizienten der IES zwischen Olivenöl und Wasser bei 20° C der Wert von etwa 1,5.

Da die Trennung des Lipoids vom Wasser mit Schwierigkeiten verbunden war, geben die mitgeteilten Werte nur die Größenordnung der Verteilung an, was aber für unsere Betrachtung völlig genügt.

Um die hier erhaltenen Resultate auf die Verhältnisse bei Pflanzen übertragen zu können, wurde der Lipoidgehalt, d. h. die durch Äther extrahierbaren Substanzen und der Wassergehalt der Cucumis-Hypokotyle bestimmt. Die Analyse ergab : Wassergehalt : 97,5 %; ätherlösliche Substanz : 0,1 %; übrige Trockensubstanz : 2,4 %. Der Lipoidgehalt ist also so gering, daß er gegenüber dem Wassergehalt der Hypokotyle bei der Berechnung der Verteilung der IES zwischen Hypokotyl und Versuchslösung vernachlässigt werden kann. Selbst im ungünstigsten Fall, wenn sich die Lipoide von *Cucumis* wie ein Gemisch von Ölsäure und Olivenöl verhielten, würde die ätherlösliche Substanz sich in ihrer Lösungseigenschaft der IES gegenüber nur wie weitere 0,7 % Wasser verhalten, so daß für die Wuchsstoffverteilung mit einem Gesamtwassergehalt der Hypokotylstücke von 98,2 % zu rechnen wäre.

Im Anschluß an die Versuchsergebnisse von Geiger-Huber und Burlet (1936) wurde auch das Verhalten der IES gegenüber einem Adsorbens (Kohle) untersucht. Bei einer normalen Adsorption gilt die von Freundlich (1922) aufgestellte Beziehung $a = \alpha \cdot c^{\frac{1}{n}}$, wobei a die Menge adsorbierter Substanz pro Gramm Adsorbens, c die Konzentration der gelösten Substanz nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts und α und $\frac{1}{n}$ Konstanten bedeuten. Es ergibt sich also, daß bei niedrigen Konzentrationen relativ mehr adsorbiert wird als bei

höheren. Logarithmiert man die Gleichung, so sind die Logarithmen der Menge adsorbierter Substanz und der Gleichgewichtskonzentration einander direkt proportional. In meinen Versuchen wurden je 20 cc von $7{,}15 \cdot 10^{-5}$ bis $1{,}14 \cdot 10^{-3}$ molarer IES-Lösung mit je 0,1 g Tierkohle



Figur 17.
Adsorption der β-Indolylessigsäure an Tierkohle bei 20° C.
a = g adsorbierte β-Indolylessigsäure pro g Kohle.
c = Gleichgewichtskonzentration der Lösung.

(übliche Handelsqualität) geschüttelt und dann die Wuchsstofflösung von der Kohle abfiltriert und der noch vorhandene IES-Gehalt bestimmt[1]. Vorversuche zeigten, daß das Gleichgewicht in drei Minuten sicher erreicht ist. Da es nicht möglich war, die Kohle in einer kürzeren Zeit als drei Minuten mit der Lösung zu mischen und wieder vollständig von ihr abzutrennen, konnte die Geschwindigkeit, mit der sich das Gleichgewicht einstellt, nicht genauer bestimmt werden. Wie Fig. 17 zeigt, wird die Freundlichsche Beziehung erfüllt. Die IES wird sehr stark von der Kohle adsorbiert. Derselbe Versuch wurde auch noch mit einer anderen Kohle, nämlich « Tierkohle pro analysi, Kahlbaum », und zwar mit nur 0,01 g Kohle pro 20 cc Lösung, ausgeführt. In Tabelle 10 sind die Werte für a (g adsorbierte IES pro Gramm Kohle) sowie diejenigen der adsorbierten Menge in Prozent der gebotenen Anfangsmenge zusammengestellt. Der große Unterschied der Adsorptionsfähigkeit der beiden Kohlenarten und die relativ starke Adsorption bei geringen Konzentrationen gegenüber höheren geht deutlich daraus hervor; wird doch schon bei einer $7{,}15 \cdot 10^{-5}$ molaren Lösung mehr als 90 % IES adsorbiert, während bei einer $1{,}14 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung nur ein Viertel bis ein Drittel an die Kohle geht.

[1] Der erste Anteil des Filtrats wurde verworfen, da er, wie Versuche zeigten, konzentrierter ist als die anfängliche Lösung. In einem Versuch enthielten die ersten 4 cc des Filtrates 88,2 γ IES, die zweiten 4 cc 83,0 γ, die dritten 4 cc 80,8 γ und die letzten 4 cc 80,0 γ, d. i. der Gehalt der Lösung vor dem Filtrieren. Es besteht also eine negative Adsorption der IES an Filtrierpapier.

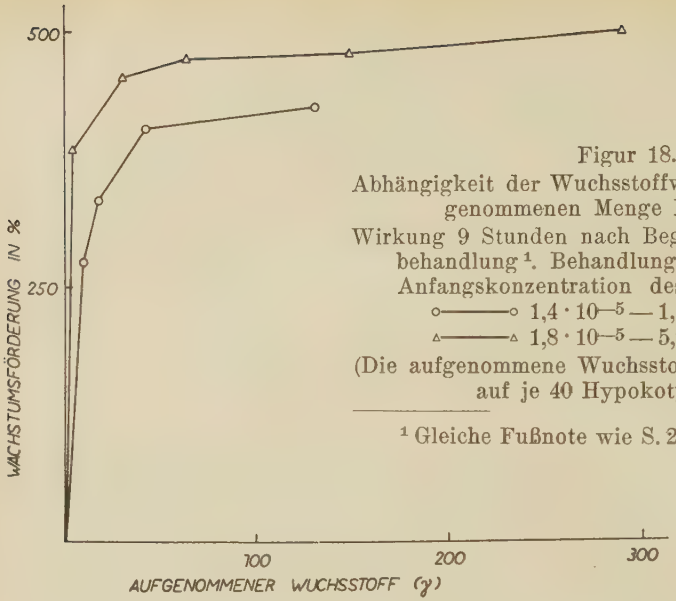
Tabelle 10.

Adsorption der IES an Tierkohle.
20 cc IES-Lösung, Schüttelzeit 30 Minuten, Temperatur 20° C.
a = g adsorbierte IES pro g Kohle.
% = adsorbierte IES in % der gebotenen Menge.

Konzentration der IES (molar)	Gebotene Menge IES (γ)	Tierkohle 0,1 g		Tierkohle 0,01 g pro analysi	
		a	%	a	%
$7{,}15 \cdot 10^{-5}$	250	0,0019	77,6	0,0232	92,8
$1{,}43 \cdot 10^{-4}$	500	0,0032	63,6	0,0476	95,2
$2{,}86 \cdot 10^{-4}$	1000	0,0052	52,0	0,0840	84,0
$5{,}71 \cdot 10^{-4}$	2000	0,0077	38,3	0,1280	64,0
$1{,}14 \cdot 10^{-3}$	4000	0,0106	26,5	0,1360	34,0

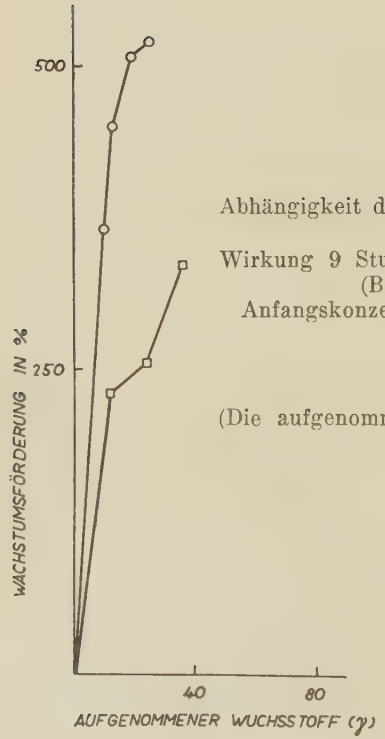
Bei den Untersuchungen über die Wuchsstoffaufnahme durch Hypokotylstücke von *Cucumis* konnte keinerlei Zusammenhang zwischen dem Wuchsstoffbedürfnis der Pflanze und der Wuchsstoffaufnahme festgestellt werden. Bringt man aber die Wirkung [1] der IES in Beziehung zur aufgenommenen Menge, so zeigt sich (Fig. 18 und 19), daß zunächst mit steigender Menge aufgenommenen Wuchsstoffes auch seine Wirkung (Wachstumsförderung gegenüber der Kontrolle ohne Wuchsstoff) stark zunimmt. Werden aber von 40 Hypokotylstücken insgesamt mehr als etwa 60 γ IES aufgenommen, so wird das Wachstum nicht mehr gefördert; es bleibt in dem bei meinen Versuchen angewendeten Konzentrationsbereich gleich. Bei noch größeren Wuchsstoffmengen würde die Förderung wahrscheinlich wieder zurückgehen und schließlich in eine Hemmung umschlagen. Der in Fig. 18 und 19 ersichtliche Kurvenverlauf läßt sich kaum anders deuten, als daß mit wachsender Besetzung der Reaktionsorte in der Zelle mit Wuchsstoffmolekülen auch die Wirkung zunimmt. Bei einer Aufnahme von 60 γ aber sind die Reaktionsorte voll besetzt, eine weitere Wuchsstoffaufnahme bleibt mindestens zunächst wirkungslos. Die Kurven lassen sich demnach als Ausdruck einer Adsorption der IES an den Reaktionsorten der Zelle deuten. Da aufgenommene Wuchsstoffmenge und Wuchsstoffwirkung einander nicht direkt proportional sind, ist der wirkende Wuchsstoff offenbar nicht frei gelöst, sondern adsorbiert in der Zelle vorhanden (s. Geiger-Huber und Sutter 1943). Die Adsorptionsvorgänge werden aber mengenmäßig durch den allerdings langsameren Diffusionsvorgang überdeckt, so daß sie bei der Wuchsstoffaufnahme nicht in Erscheinung treten.

[1] Berechnung der Wirkung (Wachstumsförderung in %): $w = \frac{v - k}{k} \cdot 100$, wobei v = jeweiliger Zuwachs des Versuchs, k = jeweiliger Zuwachs der Kontrolle bedeutet.



Figur 18.
Abhängigkeit der Wuchsstoffwirkung von der aufgenommenen Menge Heteroauxin.
Wirkung 9 Stunden nach Beginn der Wuchsstoffbehandlung[1]. Behandlungszeit 3 Stunden.
Anfangskonzentration des Heteroauxins:
○——○ $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ — $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ molar.
△——△ $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ — $5{,}7 \cdot 10^{-4}$ molar.
(Die aufgenommene Wuchsstoffmenge bezieht sich auf je 40 Hypokotylstücke.)

[1] Gleiche Fußnote wie S. 237.



Figur 19.
Abhängigkeit der Wuchsstoffwirkung von der aufgenommenen Menge Heteroauxin.
Wirkung 9 Stunden nach Beginn der Wuchsstoffbehandlung (Berechnung s. Fußnote zu Figur 18).
Anfangskonzentration des Heteroauxins: $5{,}70 \cdot 10^{-5}$ molar.
Behandlungszeiten:
○——○ 22—180 Minuten.
□——□ 40—360 Minuten.
(Die aufgenommene Wuchsstoffmenge bezieht sich auf je 40 Hypokotylstücke.)

Wahrscheinlich machen sie sich erst bei sehr viel geringeren Konzentrationen, die mit meiner Bestimmungsmethode nicht mehr erfaßt werden können, auch bei der Aufnahme geltend.

Der Grenzwert von 60 γ ist für alle Versuche auffallend konstant. Es läßt sich aus diesem Wert leicht berechnen, wieviel IES pro wachsende Zelle notwendig ist, um gerade noch die maximale Wachstumsförderung von zirka 500 % zu bewirken, da ja wachsendes und ausgewachsenes Gewebe gleichviel Wuchsstoff aufnimmt (s. S. 234). Die Wachstumszone von 21 mm Länge (s. Fig. 10) besteht im Mittel aus etwa 333 000 Zellen (Mittel aus sechs Auszählungen). Ein Hypokolytstück von 60 mm Länge muß also im Minimum 1,5 γ, seine Wachstumszone demnach rund 0,5 γ aufnehmen; pro Zelle macht dies $1{,}6 \cdot 10^{-12}$ g aus oder $5{,}5 \cdot 10^{9}$ Moleküle. Nimmt man als Ausdehnung des Heteroauxinmoleküls $50 \cdot 10^{-16}$ cm² an (s. Geiger-Huber und Burlet, 1936), so genügt eine monomolekulare Schicht des aufgenommenen Heteroauxins nicht, um die geometrisch bestimmte Oberfläche der Zelle zu bedecken. Da die Oberfläche des Protoplasmas aber sicher beträchtlich größer ist, so muß man annehmen, daß die Reaktionsorte in der Zelle auf bestimmte Stellen beschränkt sind; sie sind wahrscheinlich an ausgezeichneten Punkten im retikulären System des Protoplasmas (Geiger-Huber und Sutter, 1943) zu suchen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

A. Methodisches.

1. Die von Winkler und Petersen (1935) angegebene kolorimetrische Bestimmungsmethode des Heteroauxins wurde weiter ausgearbeitet und auf ihre Eignung für physiologische Untersuchungen geprüft.
2. Die Farbintensität des β-Indolylessigsäure enthaltenden Bestimmungsgemisches ist von der Konzentration der einzelnen Reagenzien und von der Dauer der Behandlung im Wasserbad stark abhängig. Diese Verhältnisse wurden untersucht.
3. Auf Grund dieser Untersuchungen wurde eine Arbeitsvorschrift für die Ausführung der Bestimmung angegeben.
4. Die durch die Hypokotylstücke von *Cucumis sativus* bewirkte Abnahme des Heteroauxingehaltes der Versuchslösungen wurde mit dieser Methode bestimmt.
5. Die Versuche über die Heteroauxinaufnahme wurden mit je 40 Hypokotylstücken von *Cucumis sativus L.* von 6—8 cm Länge in 25 cc Versuchslösung (hundertfach verdünnte Nährlösung nach Pfeffer-Robbins, mit oder ohne Wuchsstoffzusatz, pH 4,1—6,1), die eine Schichtdicke von zirka 3 mm hat, bei 24° C und im Dun-

keln ausgeführt. Der Wuchsstoff kam in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$—$5 \cdot 10^{-4}$ molar Heteroauxin zur Anwendung; die Behandlungszeit betrug aus technischen Gründen nie mehr als sechs Stunden.

B. Experimentelle Ergebnisse.

6. Das Wachstum der etiolierten Hypokotylstücke von *Cucumus sativus* in Versuchslösung wurde untersucht und die Wachstumsverteilung im Hypokotyl ermittelt.
7. Das Wachstum der Hypokotylstücke wird bei den verwendeten Heteroauxinkonzentrationen stark gefördert (300—500 %).
8. Das aus der Versuchslösung verschwindende Heteroauxin wird weder in der Lösung noch an den Schnittflächen in meßbaren Mengen inaktiviert, sondern von den Hypokotylstücken aufgenommen.
9. Die Geschwindigkeit der Wuchsstoffaufnahme nimmt mit zunehmender Versuchsdauer stetig ab und wird annähernd null, wenn die Heteroauxinkonzentration im Gewebe diejenige der Außenlösung erreicht hat, d. h. bei zirka 9 Stunden Behandlungszeit. Die Hälfte der Gleichgewichtskonzentration wird in zirka 80 Minuten erreicht.
10. Die aufgenommene Menge ist der Anfangskonzentration des gebotenen Heteroauxins proportional.
11. Die Aufnahme ist vom Reaktionsvolumen stark abhängig, und zwar je kleiner das Reaktionsvolumen ist, desto geringer ist die aufgenommene Wuchsstoffmenge.
12. Das Licht beeinflußt die Wuchsstoffaufnahme nicht.
13. Wachsende und nicht wachsende Hypokotylstücke nehmen gleichviel Heteroauxin aus der Lösung auf.
14. Die Wuchsstoffwirkung ist bei einer Aufnahme von weniger als 60 γ Heteroauxin pro 40 Hypokotylstücke stark von der aufgenommenen Menge abhängig; wird mehr aufgenommen, so nimmt die Wirkung (Wachstumssteigerung) nicht mehr zu.
15. Es wurden einige Modellversuche mit Heteroauxin ausgeführt, und zwar wurde die Verteilung der β-Indolylessigsäure zwischen Lipoid und Wasser und auch ihre Adsorption an Kohle bestimmt. Bei einer Konzentration des Heteroauxins von $5{,}70 \cdot 10^{-4}$ molar betragen die Verteilungskoeffizienten bei Zimmertemperatur für: Olivenöl und Wasser etwa 1,5; Äther und Wasser 20,1.

C. Theoretische Folgerungen.

16. Die Punkte 9—11 führen zu der Auffassung, daß es sich bei der Wuchsstoffaufnahme um einen Diffusionsvorgang handelt und nicht etwa um eine Adsorption oder eine « adenoide Tätigkeit ».
17. Die Inaktivierung des Heteroauxins in der Zelle muß bezogen auf die aufgenommene Menge sehr gering sein.
18. Die allenfalls für das Wachstum verbrauchte Heteroauxinmenge ist verglichen mit der aufgenommenen klein; sie kann nicht größer sein als der Fehler der Bestimmungsmethode.
19. Um eine maximale Wachstumsförderung (500 %) der Hypokotyle zu erreichen, müssen pro wachsende Zelle $5{,}5 \cdot 10^9$ Heteroauxinmoleküle aufgenommen werden; eine monomolekulare Schicht davon bedeckt die Zelloberfläche nicht.
20. Die unter 14 und 19 angeführten Resultate machen es sehr wahrscheinlich, daß der wirkende Wuchsstoff nicht frei gelöst in der Zelle vorhanden, sondern an bestimmten Zellorten adsorbiert ist.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Botanischen Anstalt der Universität Basel auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber vom Frühjahr 1941 bis Frühjahr 1943 ausgeführt. Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Geiger-Huber, möchte ich für die Überlassung des Themas und für die tatkräftige Unterstützung der Arbeit bestens danken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Senn, dem Vorsteher der Anstalt, für das wohlwollende Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, und für die Überlassung der Mittel des Instituts meinen besten Dank aussprechen.

Weiterhin danke ich Herrn A. Meyer, Hauswart der Physikalischen Anstalt Basel, für die Anfertigung der Rührapparatur, und Herrn E. Spaar, Abwart der Botanischen Anstalt, für die Anfertigung verschiedener technischer Hilfsmittel.

Basel, Botanische Anstalt der Universität, Juni 1943.

Zitierte Literatur.

1937. Albaum, H. G., Kaiser, S., and Nestler, H. A.: The relation of hydrogen-ion concentration to the penetration of 3-indole acetic acid into *Nitella* cells. Amer. Journ. Bot. **24,** 513—518.

1909. Benedict, St. R.: Die Darstellung von Glyoxylsäure als Reagens. Journ. Biol. Chem. **6,** 51—52. (Ref.: Chem. Zentralbl. I, 1645, 1909).

1935. Bonner, J., and Thimann, K. V.: Studies on the growth hormone of plants. VII. The fate of growth substance in the plant and the nature of the growth process. Journ. gen. Physiol. **18,** 649—658.

1940. Boysen-Jensen, P.: Quantitative Bestimmung der beschleunigenden Streckungswuchsstoffe in der sauren Fraktion der Ätherextrakte aus höheren Pflanzen. Planta **31,** 653—669.

1931. Brieger, R.: Behandlung und Gesamtanalyse des Pflanzenmaterials. Klein. Handbuch der Pflanzenanalyse, **1,** 516—598, Wien.

1940. Burlet, E.: Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **50,** 519—544 (Diss. Univ. Basel).

1937. Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin.

1937. Collander, R.: Einige neuere Ergebnisse und Probleme der botanischen Permeabilitätsforschung. Schriften der «Phys.-ökon. Ges. zu Königsberg (Pr.)» **69,** Heft 2—4, 251—266.

1939. Diehl, J. M., Gorter, C. J., van Iterson, G., and Kleinhoonte, A.: The influence of growth hormone on hypocotyls of *Helianthus* and the structure of their cell walls. Rec. trav. bot. néerl. **36,** 709—798.

1934. Dijkman, M. J.: Wuchsstoff und geotropische Krümmung bei *Lupinus*. Rec. trav. bot. néerl. **31,** 391—450.

1932. Dolk, H. E., and Thimann, K. V.: Studies on the growth hormone of plants. I. Proc. Nat. Acad. Sci. **18,** 30—46.

1936. Fiedler, H.: Entwicklungs- und reizphysiologische Untersuchungen an Kulturen isolierter Wurzelspitzen. Ztschr. f. Bot. **30,** 385—436.

1938. Fisher, R. A.: Statistical methods for research workers, London.

1933. Fliry, M.: Zur Wirkung der Endknospe auf die Hypokotylstreckung des Dikotylenkeimlings. Jahrb. f. wiss. Bot. **77,** 150—184.

1922. Freundlich, H.: Kapillarchemie, II. Aufl., Leipzig.

1943. Funke, H.: Über Hemm- und Wuchsstoffe des keimenden Maiskorns. Jahrb. f. wiss. Bot. **91,** 54—82.

1942. Gast, A.: Über den Einfluß der Dauer der Wuchsstoffeinwirkung auf das Wurzelwachstum. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **52,** 441—475 (Diss. Univ. Basel).

1938. Geiger-Huber, M.: Die Bewurzelung von Stecklingen als hormonphysiologisches Problem. Verhandlg. Schweiz. Naturforsch. Ges. Chur 1938. 183—185.

1936. — und Burlet, E.: Über den hormonalen Einfluß der β-Indolylessigsäure auf das Wachstum isolierter Wurzeln in keimfreier Organkultur. Jahrb. f. wiss. Bot. **84,** 233—253.

1943. — und Sutter, E.: Die Aufnahme synthetischer Wuchsstoffe durch die Pflanze. Verhandlg. Schweiz. Naturforsch. Ges. Schaffhausen 1943, 121—123.

1939a. Goodwin, R.: A comparison of two quantitative *Avena* techniques in the determination of 3-Indole acetic acid. Amer. Journ. Bot. **26,** 74—78.

1939b. — Evidence for the presence in certain ether extracts of substances partially masking the activity of auxin. Amer. Journ. Bot. **26,** 130—135.

1937. Gorter, C. J., und Funke, G. L.: Wachstum und Wuchsstoffproduktion bei Keimpflanzen von *Raphanus sativus* in trockener und feuchter Luft. Planta **26,** 532—545.

1912. Halsted, B. D.: The elongation of the hypokotyl. New Jersey Agric. Exp. Stations. Bull. **245,** 3—32.

1938. Hitchcock, A. E., and Zimmerman, P. W.: The use of green tissue test objects for determining the physiological activity of growth substances. Contrib. Boyce Thomps. Inst. **9,** 463—518.

1937. Jahnel, H.: Über den Wuchsstoff in *Lupinus albus* und seine Verteilung während einer Vegetationsperiode. Jahrb. f. wiss. Bot. **85,** 329—354.

1936. Jost, L., und Reiß, E.: Zur Physiologie der Wuchsstoffe. II. Einfluß des Heteroauxins auf Längen- und Dickenwachstum. Ztschr. f. Bot. **30,** 335—376.

1936. Juel, I.: Über die Genauigkeit der Wuchsstoffbestimmungsmethode. Planta **25,** 307—310.
1943. Kaufmann, E.: Beiträge zur Keimungsphysiologie von *Cucumis sativus* im Zusammenhang mit dem Wuchsstoffproblem. Planta **33,** 516—545.
1933. Kögl, F.: Über Auxine. Ztschr. f. angewandte Chem. **46,** 469—484.
1936. — Haagen-Smit, A.J., und van Hulssen, C.J.: Über den Einfluß unbekannter äußerer Faktoren bei Versuchen mit *Avena sativa*. Ztschr. physiol. Chem. **241,** 17—33.
1940. Koller, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Dresden und Leipzig.
1935. Kornmann, P.: Die Aufhebung der Wuchsstoffwirkung durch lebende Pflanzenteile. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **53,** 523—527.
1936. Larsen, P.: Über einen Wuchsstoff inaktivierenden Stoff aus *Phaseolus*-Keimpflanzen. Planta **25,** 311—314.
1939. — Über Hemmung des Streckungswachstums durch natürlich vorkommende ätherlösliche Stoffe. Planta **30,** 160—167.
1940. — Untersuchungen über den thermolabilen, Wuchsstoff exydierenden Stoff in *Phaseolus*-Keimpflanzen. Planta **30,** 673—682.
1940. Linser, H.: Über das Vorkommen von Hemmstoff in Pflanzenextrakten sowie über das Verhältnis von Wuchsstoffgehalt und Wuchsstoffabgabe bei Pflanzen und Pflanzenteilen. Planta **31,** 32—59.
1939. Mitchell, J.W., and Brunstetter, B.C.: Colorimetric methods for the quantitative estimation of indole (3) acetic acid. Bot. Gaz. **100,** 802—816.
1942. Musfeld, W.: Versuche über die Aufnahme von Zucker durch Hefezellen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **52,** 583—620. (Diss. Univ. Basel).
1921. Nernst, W.: Theoretische Chemie vom Standpunkte der Avogadroschen Regel und der Thermodynamik. Stuttgart.
1933. Overbeek, J. van: Wuchsstoff, Lichtwachstumsreaktion und Phototropismus bei *Raphanus*. Rec. trav. bot. néerl. **30,** 537—626.
1935. — The growth hormone and the dwarf type of growth in corn. Proc. Nat. Acad. Sci. **21,** 292—299.
1929. Pütter, A.: Die Auswertung zahlenmäßiger Beobachtungen in der Biologie. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
1936. Rieche, A., und Meister, R.: Modellversuche zur Autoxydation der Äther. Ztschr. f. angewandte Chem. **49,** 101—103.
1922. Robbins, W.J.: Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Bot. Gaz. **73,** 367—390.
1896. Rothert, W.: Über Heliotropismus. Beitr. z. Biol. d. Pfl. (Cohn) **7,** 1—212.
1937. Ruge, U.: Untersuchungen über den Einfluß des Heteroauxins auf das Streckungswachstum des Hypokotyls von *Helianthus annuus*. Ztschr. f. Bot. **31,** 1—56.
1885. Salkowski, E.: Über das Verhalten der Skatolkarbonsäure im Organismus. Ztschr. f. physiol. Chem. **9,** 22—33.
1937. Scheer, B.A.: Straigth growth of *Avena* coleoptile in relation to different concentrations of certain organic acids and their potassium salts. Amer. Journ. Bot. **24,** 559—565.
1938. Skoog, F.: Absorption and translocation of auxin. Amer. Journ. Bot. **25,** 361—372.
1941. Söding, H., und Funke, H.: Über Empfindlichkeitsschwankungen des Hafertestes und ihre Beziehung zu Wetterfaktoren. Jahrb. wiss. Bot. **90,** 1—24.
1933. Steiner, M.: Konstanten der bekannten Pflanzenstoffe, ihrer wichtigsten Abkömmlinge und einiger wichtiger Reagenzien. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, **4/II,** 1438—1707, Wien.

1934. Strugger, S.: Beiträge zur Physiologie des Wachstums. 1. Zur protoplasmaphysiologischen Kausalanalyse des Streckungswachstums. Jahrb. wiss. Bot. **79,** 406—471.
1934. Thimann, K. V.: Studies on the growth hormone of plants. VI. The distribution of the growth substance in plant tissues. Journ. gen. Physiol. **18,** 23—34.
1932. — and Bonner, J.: Studies on the growth hormone of plants. II. The entry of growth substance into the plant. Proc. Nat. Acad. Sci. **18,** 692—701.
1933. — and Bonner, J.: The mechanism of the action of the growth substance of plants. Proc. Roy. Soc. B. **113,** 126—149.
1932. Weij, van der, H. G.: Der Mechanismus des Wuchsstofftransportes. Rec. trav. bot. néerl. **29,** 379—496.
1929. Went, F. W.: Wuchsstoff und Wachstum. Rec. trav. bot. néerl. **25,** 1—116.
1937. — and Thimann, K. V.: Phytohormones. Macmillan, New York.
1934. Winkler, S.: Über die Tryptophanreaktion von Adamkiewicz-Hopkins. Ztschr. physiol. Chem. **228,** 50—60.
1935. — und Petersen, S.: Tryptophanreaktion und Nachweis des Heteroauxins. Ztschr. physiol. Chem. **231,** 210—212.
1942. Würgler, W.: Über das Wachstum der Wurzeln von *Zea Mays* in Organkultur und seine Beeinflussung durch Wirkstoffe. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **52,** 239—271. (Diss. Univ. Basel.)

Curriculum vitae.

Ich, Erika Emma Sutter, wurde am 14. Juni 1917 in Basel geboren. Meine Eltern sind Theodor Sutter, Dr. phil. Chemiker, von Bühler (Kt. Appenzell A.-Rh.) und Meta Sutter, geb. Ris.

1928—1936 besuchte ich das Mädchengymnasium Basel und bestand im Frühjahr 1936 die Maturitätsprüfung der Realabteilung.

Meine Studien absolvierte ich 1937—1943 an der Universität Basel. Im Frühjahr 1941 bestand ich das Mittellehrerexamen.

Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Kurse folgender Herren Professoren und Dozenten: Barth, Buxtorf, Edlbacher, Fichter, Geiger-Huber, Hagenbach, Handschin, Hediger, Jäger, Kuhn, Miescher, Muschg, Portmann, Rittmann, Schüepp, Senn, Vischer, Vosseler, Wehrli, Zickendraht.

Vorliegende Dissertation verfaßte ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber.

Allen meinen verehrten Lehrern danke ich bestens für die Förderung, die sie mir während meiner Studien haben angedeihen lassen.